

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



## **Valorização de Sistemas de Elevado Valor Natural: Potencialidades da Bolota do Montado**

Inês dos Santos Brilha Pinto Bento

**Mestrado em Ecologia e Gestão Ambiental**

Dissertação orientada por:  
Professora Doutora Cristina Máguas  
Doutora Marta Abreu



## Agradecimentos

Esta dissertação não seria possível sem a atenciosa orientação da Doutora Carla Alegria que desde o primeiro dia tem sido uma fonte de conhecimento, de dedicação e de paciência até para as minhas questões e indecisões existenciais, mesmo quando a vida se enchia de “peripécias”. Obrigada pela confiança depositada em mim, pela gentil exigência, por me mostrar que o caminho é sempre para a frente, pela amizade e por desvendar os segredos do word.

Agradeço às minhas orientadoras, Professora Doutora Cristina Máguas que, sempre cheia de uma energia contagiante, me motivava a dar o meu melhor, e Doutora Marta Abreu que, para além da cuidada revisão do estudo e amabilidade, partilhava do meu entusiasmo quanto à realização dos trabalhos no Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, onde fui muito bem recebida.

Devo também agradecer o meu equilíbrio emocional a toda a minha família e amigos, que me apoiaram neste ano em que o mundo está de pernas para o ar, nomeadamente à minha mãe, por ouvir todas as minhas lamúrias, sempre com um conselho necessário e carinhoso, fosse ele reconfortante ou nem por isso, por toda a alegria e força, pelo exemplo e por fazer questão de me mostrar o melhor de mim. Ao meu pai, um modelo de profissionalismo e determinação, que me encoraja a trabalhar mais e mais para aquilo que quero alcançar, que me mantém de pés na terra, e que me faz crer que não sou apenas uma pessoa de convicções, mas também que ajo conforme. A ambos, obrigada pelos lanchinhos e por acreditarem em mim, até mais que eu própria. Obrigada à minha irmã, aquela que, apesar de mais nova, me aconselha tão sabiamente, me acompanha em tantas aventuras e parvoíces, que sendo uma lutadora nata me inspira a ser mais como ela e que me enche de orgulho.

Obrigada aos meus avós por todo o amor que deles recebi. À avó Lenae ao avô João que durante este ano têm sido motivações preciosas, que me mostram que nada se consegue sem trabalho, sendo eles provas vivas disso mesmo. Tenho muito a agradecer aos meus padrinhos e primos, uma referência de boa disposição, ânimo e persistência, sempre em cima do acontecimento! Obrigada pelas invenções culinárias, por todo o carinho e pelo entusiasmo naquilo que faço.

Agradeço ao Zé, que se tornou um suporte constante, alguém que me deixa instantaneamente alegre e pronta para enfrentar o que vier, obrigada também pela secretária nos momentos de aflição, és dos fixes. Um gigante obrigada aos meus amigos “aqui de perto” e aos que a vida universitária me trouxe, são essenciais para este trabalho ter sido feito com sanidade mental, obrigada pelas incontáveis histórias, por preencherem a minha vida, e claro, por serem *patchaus*!

Agradeço também ao grupo ESFE do CE3C, onde fui muito bem recebida, onde me foi dada uma grande oportunidade de aprendizagem e onde me foi proporcionado um ótimo ambiente de trabalho, designadamente ao Mestre João Jacinto que me ofereceu ajuda durante inúmeros momentos deste estudo.

Gostaria também de agradecer à Professora Doutora Anabela Silva pelo apoio a nível laboratorial e pela enorme simpatia e disponibilidade constantes.

Ao Professor Doutor José Granadeiro pela pronta e gentil ajuda a nível do sistema de informação geográfica e ainda por ter enfatizado qual o cerne da realização de uma dissertação.

Ao Professor Doutor Tiago Marques por ter tão prontamente prestado o auxílio requerido, acompanhado da sua característica boa disposição e entusiasmo.

À Doutora Cristina Antunes pela amável recolha de dados bioclimáticos, potencial de evapotranspiração e índice de aridez, através do ArcMap.

Este trabalho teve o apoio dos projetos "Adding value to Montado acorn production: Innovation and tradition for a sustainable growth" (SFRH/BPD/126703/2016) e "REALMed - Pursuing authenticity and valorization of Mediterranean traditional products" (ARIMNet2, 2014–2017; ERA-NET grant

agreement No. 618127; FCT ARIMNET2/0005/2016), onde foram cedidos os dados morfológicos, fenólicos e dos compostos isotópicos e elementares da bolota utilizada de ambas as espécies, bem como as respetivas amostras.

Por último, mas não menos importante, quero agradecer a todos os que de alguma forma contribuíram não só para a realização deste trabalho, como para o meu crescimento e formação.

Sei que sou aquela pessoa que diz demasiados “obrigadas”, mas se há um momento para o fazer, é este: Obrigada!



## Resumo

De entre as propostas de inovação alimentar a favor da sustentabilidade do sistema produtivo, salientam-se as linhas de investigação com foco na procura de novas fontes alimentares ou no desenvolvimento de estratégias de valorização das mesmas. Neste sentido, a bolota apresenta-se como uma fonte alimentar alternativa que abunda no sistema de Elevado Valor Natural (EVN) Montado. Assim, foram avaliadas diferentes características de bolotas de *Quercus rotundifolia* (QR) e *Q. suber* (QS) ao longo de um gradiente climático com o objetivo de explorar a potencialidade de valorização das bolotas como fonte alimentar e como indicador das respostas de adaptação do ecossistema às alterações climáticas e ambientais.

Foi possível distinguir as espécies de bolota com base nas características morfológicas (comprimento, volume, peso), químicas (teores em sacarose, glucose, amido, proteína) e composição elementar (conteúdo em azoto, carbono e rácio C/N). De acordo, as bolotas QR verificam maiores dimensões, sendo os respetivos teores em sacarose e amido 10 e 1.6 vezes superiores aos das QS. Ainda as bolotas QR, apresentam conteúdo em carbono e rácio C/N superiores aos das QS, sugerindo teores lipídicos superiores nas bolotas QR. Características que inviabilizam a distinção entre as espécies de bolota reportam às diferenças não significativas nos teores em frutose, compostos fenólicos, incluindo taninos, e composição isotópica em  $\delta^{15}\text{N}$  e  $\delta^{13}\text{C}$ .

Na contextualização das espécies nas condições ambientais e climáticas, as diferenças entre as características das bolotas são reveladoras da influência das variáveis bioclimáticas e do índice de aridez. Destas, destaca-se o aumento do comprimento das bolotas, da fração insolúvel dos açúcares (amido) e enriquecimento em  $^{15}\text{N}$  concordantes com o aumento da aridez dos locais de colheita das bolotas de ambas as espécies. No particular, observou-se uma tendência de aumento dos teores de sacarose em QR e de glucose em QS em resposta às condições mais áridas, assim como um enriquecimento em  $^{13}\text{C}$  das bolotas QS consequente do aumento da temperatura anual dos locais amostrados. As relações encontradas revelam, para ambas as espécies, estratégias de adaptação às condições ambientais do ecossistema, indicando um maior investimento das plantas nas suas sementes em condições de maior stress hídrico e limitações na disponibilidade de nutrientes do solo.

No aproveitamento alimentar da bolota, nomeadamente para a obtenção de farinhas ou para a extração de ingredientes alimentares, é encontrada maior aptidão tecnológica nas bolotas de QR, associado a um maior valor energético. Estas, além dos teores em sacarose que conferem uma maior perceção de doçura, apresentam quantitativos em amido que justificam a preferência face às bolotas de QS, particularmente as provenientes de locais com condições mais áridas que potenciam o rendimento em amido. A extração de compostos bioativos, objetivando a incorporação em alimentos ou produtos não alimentares (*e.g.*, cosméticos e suplementos), deverá ser igualmente considerada na valorização da bolota pelas elevadas concentrações em compostos fenólicos presentes, independentemente da espécie.

Este estudo demonstra, assim, o potencial de valorização da bolota do sistema EVN Montado, quer como fonte alimentar alternativa quer como ferramenta na avaliação da performance do ecossistema, dando indícios para o estabelecimento de uma estratégia de valorização global, integrando conceitos como sustentabilidade, segurança alimentar e economia circular.

**Palavras-chave:** *Quercus* spp.; fonte alimentar alternativa; gradiente climático; Amido; Indicador Ambiental.

# Abstract

Among innovation strategies in the food industry benefiting the sustainability of the productive system, the focus is on research lines searching new food sources or developing valorisation strategies of those sources. In this context, acorns, as an abundant food resource from the High Nature Value (HNV) Montado system, fit this strategy. Thus, different traits of *Quercus rotundifolia* (QR) and *Quercus suber* (QS) acorns were evaluated along a climatic gradient, aiming to explore the acorns valorisation potential as an alternative food source as well as an indicator to the ecosystem adaptation responses to environmental changes.

This study was able to distinguish acorn species based on morphological (length, volume, weight), chemical (sucrose, glucose, starch, protein contents) and elemental composition (nitrogen and carbon contents, C/N ratio) traits. QR acorns have larger dimensions and sucrose and starch contents 10 and 1.6 times higher than QS acorns. Moreover, QR acorns show higher carbon content and C/N ratio than the ones from QS, suggesting higher fat contents in acorns from QR. The traits which did not allow the distinction between acorn's species are related to the non-significant differences in total phenolic content, including tannins, and isotopic composition in  $\delta^{15}\text{N}$  and  $\delta^{13}\text{C}$ .

In the integration of the species on environmental and climatic conditions, the dissimilarities between acorns' traits reveal the influence of bioclimatic variables and the aridity index. From these traits, the study highlights the increase on acorns' length and insoluble sugars' fraction (starch), and  $^{15}\text{N}$  enrichment, consistent with the increase in the aridity of the acorn geographic location of both species. Notably, there was an increasing tendency in sucrose content in QR acorns and of glucose in QS acorns in response to more arid conditions, along with a QS acorn  $^{13}\text{C}$  enrichment consequent to the increase in annual temperature of the sampled sites. The found relationships in both species reveal adaptation strategies to the ecosystem's environmental conditions, showing plants investment in seeds regarding water stress and limiting soil nutrient availability.

To acorn's food use, namely for flour processing or as a matrix for food ingredients' recovery, a better technological aptitude is found in QR acorns, related to a higher energetic value. These acorns, besides their sucrose levels offering higher sweetness perception, provide starch quantities that justify their preference regarding acorns from QS, especially those collected from more arid locations, boosting starch yield. The recovery of bioactive compounds, aiming for incorporation in food or non-food products (*e.g.*, cosmetics and supplements), should be equally acknowledged in the valorisation of acorns due to high phenolic concentrations, regardless of the species.

This study thus underlines the valorisation potential of the HNV Montado system acorns, not only as an alternative food source but also as a tool for ecosystem performance assessment, providing evidence for the establishment of a global valorisation strategy, merging concepts such as sustainability, food safety and circular economy.

**Keywords:** Acorn; *Quercus* spp.; valorisation; alternative food source; climate gradient.

# Índice

Agradecimentos.....	i
Resumo.....	iii
Abstract.....	iv
Índice.....	v
Lista de Figuras.....	vii
Lista de Tabelas.....	ix
1 Revisão Bibliográfica.....	1
1.1 Introdução.....	1
1.2 O Desafio da Sustentabilidade Alimentar.....	2
1.3 Montado: Sistema de Elevado Valor Natural.....	3
1.4 Bolota: Aspetos Botânicos, Químicos e Ecofisiológicos.....	10
1.4.1 Caracterização Botânica e Química.....	10
1.4.2 Caracterização Ecofisiológica.....	12
1.5 Potencialidades de Valorização da Bolota.....	14
1.5.1 Composição Nutricional e Funcional.....	15
1.5.2 Valorização Alimentar e Aptidão Tecnológica.....	16
2 Objetivos.....	19
3 Materiais e Métodos.....	20
3.1 Locais de Estudo.....	20
3.2 Material Biológico.....	20
3.3 Variáveis Bioclimáticas, Índice de Aridez e Potencial de Evapotranspiração.....	21
3.4 Métodos Analíticos.....	22
3.4.1 Análise Morfológica.....	22
3.4.2 Determinação do Conteúdo em Açúcares Solúveis e Amido.....	23
3.4.3 Determinação do Conteúdo Fenólico Total e Taninos.....	24
3.4.4 Determinação do Teor em Proteína.....	24
3.4.5 Composição Isotópica e Análise Elementar.....	25
3.5 Tratamento Estatístico.....	25
4 Resultados e Discussão.....	27
4.1 Características Morfológicas, Químicas e Isotópicas da Bolota em Função da Espécie.....	27
4.1.1 Respostas Morfológicas.....	27
4.1.2 Respostas Químicas.....	28
4.1.3 Respostas Isotópicas e Elementares.....	34

4.2	Efeitos das Condições Climáticas e Ambientais nas Características Morfológicas, Químicas e Isotópicas da Bolota em Função da Espécie.....	36
4.2.1	Integração das Espécies no Contexto Ambiental .....	37
4.2.2	Influência da Variação Climática em Função da Espécie nas Respostas Morfológicas, Químicas e Isotópicas.....	46
5	Conclusões.....	58
6	Referências Bibliográficas.....	60
	Anexos.....	69
	Anexo 1.....	69
	Anexo 2.....	76
	Anexo 3.....	78
	Anexo 4.....	79



## Lista de Figuras

<b>Figura 1.1.</b> Montado Alentejano. Fonte: <a href="http://www.herdadedofreixodomeio.pt">www.herdadedofreixodomeio.pt</a>	3
<b>Figura 1.2.</b> Detalhes fotográficos de <i>Q. suber</i> . <b>a)</b> Floração [a1 e 2 – Fotos de Ana Júlia Pereira; <a href="http://flora-on.pt">flora-on.pt</a> ]; <b>b)</b> Frutificação (bolota/lande) [b1 – foto de Ana Júlia Pereira; <a href="http://flora-on.pt">flora-on.pt</a> ; b2 – foto de Carla Alegria, 2018]; <b>c)</b> Folhas [c1 – foto de Ana Júlia Pereira; <a href="http://flora-on.pt">flora-on.pt</a> ; c2 – foto de L. Lopes, 2005; Biorede].	5
<b>Figura 1.3.</b> <b>a)</b> Distribuição geográfica de <i>Q. suber</i> (QS) em Portugal continental (Carapeto <i>et al.</i> , 2020; <a href="http://Flora-on">Flora-on</a> ); <b>b)</b> Tronco de QS descortçado (ICNF - IFN6, 2019); <b>c)</b> Montado de Sobre (Passarinho <i>et al.</i> , 2019).	6
<b>Figura 1.4.</b> Detalhes fotográficos de <i>Q. rotundifolia</i> . <b>a)</b> Floração [a1 – foto de Pedro Pinho; a2 – foto de Ana Júlia Pereira; <a href="http://flora-on.pt">flora-on.pt</a> ]; <b>b)</b> Frutificação (bolota) [b1 e 2 – fotos de Carla Alegria, 2017, 2018]; <b>c)</b> Folhas [c1 e 2 – fotos de Ana Júlia Pereira; <a href="http://flora-on.pt">flora-on.pt</a> ].	8
<b>Figura 1.5.</b> <b>a)</b> Distribuição geográfica de <i>Q. rotundifolia</i> (QR) em Portugal continental (Porto <i>et al.</i> , 2020; <a href="http://Flora-on">Flora-on</a> ); <b>b)</b> Azinheira isolada (foto de Carla Alegria, 2018); <b>c)</b> Montado de Azinho (foto de Carla Alegria, 2018).	9
<b>Figura 1.6.</b> Secção longitudinal de uma bolota. Adaptado de Vinha <i>et al.</i> (2016).	10
<b>Figura 1.7.</b> Usos tradicionais de bolota. <b>a)</b> Óleo de bolota [Fonte: Forager's Harvest] <b>b)</b> Pão de mistura à base de farinha de bolota de azinheira (um terço) e de farinha de trigo (dois terços) [Fonte: Moinho de Pisões]. <b>c)</b> Farinha de bolota [fonte: Centro Ciência Viva da floresta, Proença-a-Nova].	14
<b>Figura 1.8.</b> Estratégia de valorização da bolota (adaptado de Alegria (2018) e Giovanetti <i>et al.</i> (2018)).	16
<b>Figura 3.1.</b> Distribuição no gradiente de aridez dos locais de amostragem QR e QS na região do Alentejo (Mapa gerado em QGIS 3.14).	20
<b>Figura 4.1.</b> Box-plots dos teores em sacarose de bolota de <i>Q. rotundifolia</i> e <i>Q. suber</i> . Diferenças significativas entre as amostras de bolota são indicadas com letras diferentes (post-hoc Kruskal-Wallis, $\alpha=0.05$ ).	29
<b>Figura 4.2.</b> Box-plots dos teores em amido de bolota de <i>Q. rotundifolia</i> e <i>Q. suber</i> . Diferenças significativas entre as amostras de bolota são indicadas com letras diferentes (post-hoc Kruskal-Wallis, $\alpha=0.05$ ).	30
<b>Figura 4.3.</b> Box-plots do conteúdo em Açúcares Total (a) e dos contributos percentuais de açúcares solúveis (b) e insolúveis (c) de bolota de <i>Q. rotundifolia</i> e <i>Q. suber</i> . Diferenças significativas entre as amostras de bolota são indicadas com letras diferentes (post-hoc Kruskal-Wallis, $\alpha=0.05$ ).	31
<b>Figura 4.4.</b> Box-plots do conteúdo fenólico total (CFT) (a) e do conteúdo em taninos (CT) (b) de bolota de <i>Q. rotundifolia</i> e <i>Q. suber</i> . ns – diferenças não significativas a $p<0.05$ (post-hoc Kruskal-Wallis).	32
<b>Figura 4.5.</b> Box-plots do teor em proteína de bolota de <i>Q. rotundifolia</i> e <i>Q. suber</i> . Diferenças significativas entre as amostras de bolota são indicadas com letras diferentes (post-hoc Kruskal-Wallis, $\alpha=0.05$ ).	33
<b>Figura 4.6.</b> Box-plots da composição isotópica $\delta^{15}\text{N}$ (a; $\text{d}^{15}\text{N}$ ) e $\delta^{13}\text{C}$ (b; $\text{d}^{13}\text{C}$ ) de bolota de <i>Q. rotundifolia</i> e <i>Q. suber</i> . Diferenças significativas entre as amostras de bolota são indicadas com letras diferentes (post-hoc Kruskal-Wallis, $\alpha=0.05$ ). ns – diferenças não significativas a $p<0.05$ (post-hoc Kruskal-Wallis).	34

<b>Figura 4.7.</b> Box-plots do conteúdo em sacarose, glucose, frutose e amido de bolota de <i>Q. rotundifolia</i> e <i>Q. suber</i> de acordo com a classe de aridez. Diferenças significativas entre as amostras de bolota são indicadas com letras diferentes (post-hoc Kruskal-Wallis, $\alpha=0.05$ ). ns – não significativo.	39
<b>Figura 4.8.</b> Box-plots do conteúdo em açúcares totais (a), contributos percentuais de açúcares solúveis (b) e de açúcares insolúveis (c) de bolota de <i>Q. rotundifolia</i> e <i>Q. suber</i> de acordo com a classe de aridez. Diferenças significativas entre as amostras de bolota são indicadas com letras diferentes (post-hoc Kruskal-Wallis, $\alpha=0.05$ ).	41
<b>Figura 4.9.</b> Box-plots do conteúdo fenólico total e conteúdo tanino de bolota de <i>Q. rotundifolia</i> e <i>Q. suber</i> de acordo com a classe de aridez. ns – não significativo (post-hoc Kruskal-Wallis, $\alpha=0.05$ ).	42
<b>Figura 4.10.</b> Box-plots do conteúdo percentual em proteína de bolota de <i>Q. rotundifolia</i> e <i>Q. suber</i> de acordo com a classe de aridez. Diferenças significativas entre as amostras de bolota são indicadas com letras diferentes (post-hoc Kruskal-Wallis, $\alpha=0.05$ ).	43
<b>Figura 4.11.</b> Biplot PC1 x PC2 sobre as variáveis morfológicas, químicas e isotópicas de bolota QR e QS de acordo com a classe de aridez. A codificação das variáveis é apresentada na Tabela 4.11.	45
<b>Figura 4.12.</b> Biplot PC1 x PC2 ( <i>score plot</i> ) das amostras de bolota de QR e QS de acordo com a classe de aridez.	46
<b>Figura 4.13.</b> Projeção do modelo de regressão múltipla da variação dos conteúdos em sacarose de <i>Quercus suber</i> .	50
<b>Figura 4.14.</b> Projeção do modelo de regressão múltipla da variação dos conteúdos em glucose de <i>Quercus rotundifolia</i> .	51
<b>Figura 4.15.</b> Projeção do modelo de regressão múltipla da variação dos conteúdos em frutose de <i>Quercus rotundifolia</i> .	52
<b>Figura 4.16</b> Projeção do modelo de regressão múltipla da variação dos conteúdos em amido de <i>Quercus rotundifolia</i> (a) e de <i>Quercus suber</i> (b).	53
<b>Figura 4.17.</b> Projeção do modelo de regressão múltipla da variação dos conteúdos em açúcares solúveis (%) e de açúcares insolúveis (%) de <i>Quercus rotundifolia</i> (a) e de <i>Quercus suber</i> (b).	54
<b>Figura 4.18.</b> Projeção do modelo de regressão múltipla da variação do conteúdo fenólico total de <i>Quercus suber</i> .	55
<b>Figura 4.19.</b> Projeção do modelo de regressão múltipla da variação do conteúdo tanino de <i>Quercus suber</i> .	56
<b>Figura 4.20.</b> Projeção do modelo de regressão múltipla da variação do conteúdo em isótopos estáveis de carbono de <i>Quercus suber</i> .	57

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1.1.</b> Composição (g/100 g) nutricional e fenólica de bolota de azinheira ( <i>Q. rotundifolia</i> ) e de sobreiro ( <i>Q. suber</i> ) colhidas em Portugal. Adaptado de de Oliveira <i>et al.</i> , 2012.	12
<b>Tabela 3.1.</b> Descrição das variáveis bioclimáticas, abreviação e cálculo.	21
<b>Tabela 3.2.</b> Sumário estatístico das 19 variáveis bioclimáticas, índice de aridez (IA) e potencial de evapotranspiração (PET) dos locais de amostragem de ambas as espécies, <i>Q. rotundifolia</i> e <i>Q. suber</i> .	22
<b>Tabela 4.1.</b> Parâmetros morfológicos das amostras de bolota das espécies <i>Quercus rotundifolia</i> e <i>Quercus suber</i> .	27
<b>Tabela 4.2.</b> Matriz de correlações de Spearman entre as respostas morfológicas avaliadas em bolotas de <i>Q. rotundifolia</i> (QR; identificado a amarelo) e de <i>Q. suber</i> (QS; identificado a verde).	28
<b>Tabela 4.3.</b> Conteúdo em glucose e frutose das amostras de bolota das espécies <i>Quercus rotundifolia</i> e <i>Quercus suber</i> .	29
<b>Tabela 4.4.</b> Matriz de correlações de Spearman entre as respostas relativas à componente de açúcares avaliadas em bolotas de <i>Q. rotundifolia</i> (QR; identificado a amarelo) e de <i>Q. suber</i> (QS; identificado a verde).	32
<b>Tabela 4.5.</b> Matriz de correlações de Spearman entre as respostas fenólicas avaliadas em bolotas de <i>Q. rotundifolia</i> (QR; identificado a amarelo) e de <i>Q. suber</i> (QS; identificado a verde).	33
<b>Tabela 4.6.</b> Conteúdo em azoto, carbono e rácio C/N das amostras de bolota das espécies <i>Quercus rotundifolia</i> e <i>Quercus suber</i> .	35
<b>Tabela 4.7.</b> Matriz de correlações de Spearman entre as respostas isotópicas e elementares e as respostas integradoras dos parâmetros morfológicos e químicos (açúcares, fenólicos e proteína) avaliadas em bolotas de <i>Q. rotundifolia</i> (QR; identificado a amarelo) e de <i>Q. suber</i> (QS; identificado a verde).	36
<b>Tabela 4.8.</b> Classes climáticas dos locais de amostragem de bolota de <i>Q. rotundifolia</i> e de <i>Q. suber</i> .	37
<b>Tabela 4.9.</b> Parâmetros morfológicos das amostras de bolota de <i>Q. rotundifolia</i> e de <i>Q. suber</i> de acordo com a classe de aridez.	38
<b>Tabela 4.10.</b> Composição isotópica em $\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{13}\text{C}$ , conteúdos em azoto (N) e carbono (N), e rácio C/N em bolota de <i>Q. rotundifolia</i> e <i>Q. suber</i> de acordo com a classe de aridez.	43
<b>Tabela 4.11.</b> Variáveis e amostras codificadas utilizadas para a análise em componentes principais (PCA) para avaliação dos parâmetros de qualidade e ecofisiológicos de bolota de duas espécies sob a influência da classe de aridez.	44
<b>Tabela 4.12.</b> Modelos de regressão múltipla com significado estatístico para as respostas de bolota de <i>Q. rotundifolia</i> .	47
<b>Tabela 4.13.</b> Modelos de regressão múltipla com significado estatístico para as respostas de bolota de <i>Q. suber</i> .	48
<b>Tabela 4.14.</b> Resumo das equações dos modelos de regressão linear múltipla significativos obtidos para as respostas de bolota de <i>Q. rotundifolia</i> e de <i>Q. suber</i> .	49

# 1 Revisão Bibliográfica

## 1.1 Introdução

Na última década tem-se verificado um aumento da consciência ambiental, motivado pelos efeitos significativos das alterações climáticas e do impacto sobre as populações. Estas preocupações têm estimulado a alteração de comportamentos por parte dos consumidores em que o aumento da procura de informação sobre a sustentabilidade do sistema produtivo (nomeadamente do impacto ambiental) e sobre a qualidade nutricional e funcional dos alimentos (benefícios para a saúde) são as principais diretrizes.

Em resposta a estas motivações, a indústria tem perseguido estratégias que incluem, quer o desenvolvimento de novos produtos alimentares que correspondam aos novos requisitos dos consumidores, quer a exploração de novas fontes alimentares e valorização dos respetivos coprodutos, impulsionando assim o desenvolvimento de sistemas de produção alimentar sustentáveis e a da economia circular (Lofthouse & Prendeville, 2018).

A preservação e valorização de recursos biológicos, culturais e ambientais, em sintonia com os conceitos de sustentabilidade, segurança alimentar e economia circular, são questões fundamentais dos sistemas agro-florestais de Elevado Valor Natural (EVN). Estes sistemas são caracterizados por elevadas valências: produção de bens agrícolas, conservação de habitats, e valor intrínseco de sustentabilidade humano-ambiental (EIP-AGRI HNV Final Report, 2016). Não obstante, nos atuais cenários de mudança, a compreensão das relações entre as paisagens tradicionais, uso/valorização de recursos e conservação da biodiversidade deve ser abordada numa perspetiva holística, a fim de preservar a segurança alimentar, os serviços de ecossistema e a qualidade do meio ambiente a longo prazo.

A região Mediterrânica é caracterizada por sistemas agrícolas tradicionais de baixa intensidade, como pastagens semi-naturais dedicadas à agro-silvicultura, onde prevalece a conservação da biodiversidade. O Montado é um exemplo reconhecido de um sistema EVN mediterrânico, ecossistema agrosilvopastoril único, encontrado apenas na Península Ibérica. Como outros sistemas EVN, é caracterizado pela heterogeneidade do habitat, devido às interações solo-clima, densidade da cobertura de árvores, pastos dispersos ou manchas de arbustos. O género *Quercus* (principalmente *Quercus suber* e *Q. rotundifolia*; cerca de 40 árvores maduras/ha) é dominante nesta paisagem onde se verificam simultaneamente áreas de cultivo e vegetação nativa (Gea-Izquierdo *et al.*, 2006). Os produtos agrícolas deste sistema EVN são considerados um recurso valioso para o desenvolvimento sustentável e um incentivo às atividades socioeconómicas locais. Nesse sentido, os esforços devem ser direcionados para melhorar a conveniência e o apelo de alimentos agroecologicamente sustentáveis deste sistema tradicional.

Na região do Alentejo, onde o Montado prevalece, estima-se que sejam produzidos 383 920 t/ano de bolota proveniente de azinheira (*Q. rotundifolia*) e de sobreiro (*Q. suber*) (ICNF, 2019). Destas, apenas cerca de 41% são utilizadas para alimentação animal, nomeadamente durante o regime de acabamento do porco preto Alentejano (montanheira) e fauna selvagem (Sottomayor, 2015). Apesar do reconhecimento da bolota como um recurso da floresta com potencial para alimentação humana pelo seu valor nutricional, 55% da produção de bolota é desprezada, sem qualquer tipo de valorização.

A valorização deste fruto justifica-se pelo seu valor nutricional e teores em fitoquímicos com reconhecida atividade biológica. Assim, as bolotas são um alimento sustentável, com potencial aplicação como ingrediente alimentar funcional (*e.g.*, espessante) ou para outras aplicações industriais para além da indústria alimentar, apoiando estratégias de valorização diferenciadas, considerando a totalidade do fruto. Acresce ainda a utilização da bolota como ferramenta para avaliar o "status" do ecossistema,

forneendo informações sobre as respostas adaptativas de *Q. suber* e *Q. rotundifolia* num contexto climático cada vez mais preocupante. Ao definir uma estratégia global de valorização deste produto, promove-se o aproveitamento de um alimento da floresta negligenciado, contribuindo-se ainda para o cumprimento de diversos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável – Agenda 2030 da ONU (e.g., ODS2 - erradicar a fome; ODS3 – saúde de qualidade; ODS8 – trabalho digno e crescimento económico; ODS9 – indústria, inovação e infraestruturas; ODS12 – produção e consumo sustentáveis; ODS13 – ação climática; ODS15 – proteger a vida terrestre), enquanto se inova e promove a sustentabilidade deste Sistema de Elevado Valor Natural - o Montado.

## 1.2 O Desafio da Sustentabilidade Alimentar

O solo sustenta grande parte da vida humana, providenciando fontes de água, alimentos e múltiplos serviços de ecossistema. De acordo com o *Intergovernmental Panel on Climate Change* (IPCC), mais de 70% do solo é sujeito a degradação com origem em atividades antropogénicas, pelo que a consciencialização das populações é capital para o desenvolvimento sustentável e mitigação dos efeitos da sua ocupação/utilização (IPCC, 2019). De facto, é notório o aumento da consciencialização dos consumidores, contribuindo para uma alteração de comportamentos que implicam escolhas mais saudáveis e com menor impacto ambiental na aquisição de produtos alimentares (Pereira, 2017; Madeira, 2015).

As campanhas de sensibilização por parte de diversas instituições e entidades tem sido fundamental para aumentar esta consciencialização, e são várias as ações promovidas nesse âmbito. A título de exemplo, em Portugal, a Associação Portuguesa de Nutrição lançou em 2017, uma série de recomendações, baseadas nas da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO), para uma alimentação mais saudável e sustentável, recomendando a aquisição de produtos locais e da época, assim como a adoção da Dieta Mediterrânica (DM) pelos comprovados benefícios a nível da saúde, sustentabilidade e promoção do bem-estar social (APN, 2017).

No dossier de candidatura a Património Cultural Imaterial da Humanidade à UNESCO em 2010, pode ler-se que a DM é uma prática social que liga a paisagem à mesa e é baseada no conhecimento, cultura e tradições envolvidos na produção, transformação e consumo de alimentos. A DM é reconhecida como tradicional e única, face à qualidade dos alimentos que produz e consome, tendo um papel fundamental nas dinâmicas locais a nível socioeconómico e na conservação dos recursos naturais, contribuindo para a herança cultural das populações Mediterrânicas. No entanto, a agricultura Mediterrânica encontra-se como globalmente menos capaz de fornecer alimentos suficientes dada a crescente tendência demográfica, especialmente considerando as alterações ambientais e sociais que impactam os sistemas agro-alimentares e o recurso água.

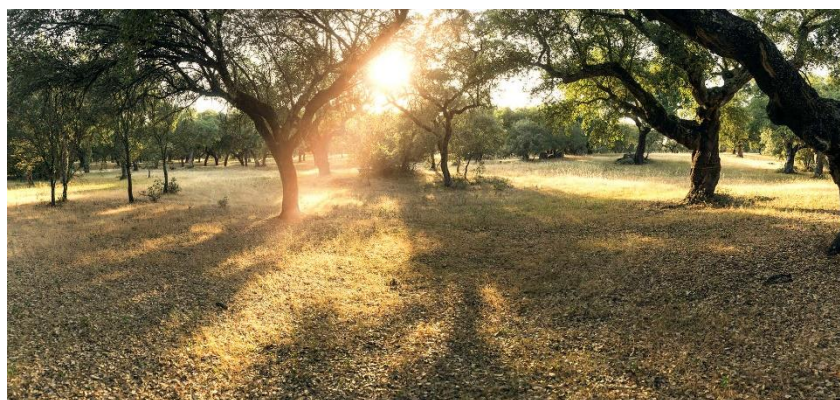
Com maior abrangência relativamente à mensagem veiculada pela DM, foi criada em 2015 a Agenda 2030 das Nações Unidas, que representa um compromisso internacional assumido por vários países de modo a efetivar os direitos humanos e a promover o desenvolvimento sustentável, nas dimensões social, económica e ambiental (UN, 2015). Na Agenda 2030 são identificados 17 Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) e estabelecidas 169 metas, incluindo desafios desde a ação climática à inovação, e envolvem diferentes sectores de atividade. Destes ODS, destaca-se o Objetivo 2, que se refere à promoção de sistemas de produção alimentar sustentáveis e resilientes, privilegiando a valorização de produtos locais, visando o bem-estar e a saúde humana. Neste contexto, o aproveitamento de fontes alimentares negligenciadas ou desenvolvimento de novos produtos a partir de tais fontes, como a bolota, em sistemas de Elevado Valor Natural, como o Montado Alentejano – ecossistema afetado pela crise climática, nomeadamente pela crescente aridez e escassez de água na região (ODS6, ODS13) – são estratégias de valorização através da inovação (ODS9), promovendo o

crescimento socioeconómico e conservação de biodiversidade (ODS15). A bolota, alimento abundante no Montado pelo coberto dos existentes sobreiros e azinheiras, apresenta características que sustentam uma estratégia global de valorização, desde o fruto à casca, com potenciais aplicações na indústria alimentar e outras (*e.g.*, farmacêutica), cumprindo os objetivos da economia circular.

### 1.3 Montado: Sistema de Elevado Valor Natural

No início dos anos 90, aumentou o reconhecimento de que a conservação da biodiversidade na Europa depende, em parte, da continuação e manutenção de determinados sistemas agrícolas, nomeadamente aqueles que, simultaneamente, com a produção de bens agrícolas (valor socioeconómico), visam a conservação de habitats, biodiversidade e serviços do ecossistema (valor ecológico). Deste reconhecimento surge, a nível europeu, o conceito de sistemas de Elevado Valor Natural (EVN), em que se associa o uso do território para fins agrícolas à preservação da diversidade de espécies e habitats, principalmente se forem de interesse conservacionista (EFNCP, 2020). Reunidas estas condições, a Agência Europeia do Ambiente regista estas áreas, enfatizando a sua importância (EEA, 2017) e, por exemplo, sob a alçada da Política Agrícola Comum da União Europeia, é possível aceder a medidas de suporte no sentido de sustentar a manutenção destes sistemas, nomeadamente através de subsídios e de programas de desenvolvimento.

Enquadrado neste conceito de sistema de EVN, o sistema agrosilvopastoral Montado (Figura 1.1), em Portugal, ou *Dehesa*, em Espanha, cobre cerca de 3,5-4 milhões de hectares na região Sudeste da Península Ibérica, formando habitats heterogêneos, em mosaicos de usos, desde áreas de mato a zonas de pastagem/agricultura e cujo coberto arbóreo (20-80 árvores/ha; Rodríguez-Estévez *et al.*, 2007) é dominado por sobreiros (*Q. suber*) e azinheiras (*Q. rotundifolia*) (Pinto-Correia *et al.*, 2011). Como sistema produtivo multifacetado, o Montado combina exploração florestal, pecuária extensiva, pastos e cultura de cereais entre outros usos tradicionais, como a caça, apicultura (tirando partido de plantas arbustivas, nomeadamente a *Lavandula viridis* - lavanda amarela) e a apanha de cogumelos. A produção animal (ovelhas, bovinos, caprinos, suínos e cavalos) é uma das atividades dominantes e também aquela que representa um forte contributo para o rendimento das populações rurais (Pinto Correia, 1993; Bugalho *et al.*, 2011).



**Figura 1.1.** Montado Alentejano. Fonte: [www.herdadedofreixodomeio.pt](http://www.herdadedofreixodomeio.pt)

O sistema Montado resulta da transformação de florestas de carvalho ancestrais pela ação humana no decorrer de centenas de anos (Bugalho *et al.*, 2011). O regime de baixa intensidade agrícola que se verifica no Montado combina uma série de bens e serviços, denominados por serviços do ecossistema (SE). Estes SE variam de serviços diretos de aprovisionamento (*e.g.*, produção de cortiça, produção animal), a serviços de suporte e regulação (*e.g.*, sequestro de carbono, conservação dos solos,

tampão à desertificação) e usos culturais (Branco *et al.*, 2010). Entre os SE diretos, destacam-se a produção lucrativa de cortiça e a produção de madeira, consequentes da vasta área de coberto dominada por carvalhos (*Quercus* sp. – 930 000 ha). Associada a esta produção encontra-se a recolha de bolota, um fruto que desde a Idade do Cobre até aos dias de hoje é utilizado para fins alimentares, quer animal como humana (Batista, 2017). O mosaico paisagístico e o ecoturismo são importantes SE culturais, onde se inclui igualmente a herança arqueológica e arquitetónica da região. Não menos pertinente é a herança intangível, como o artesanato e a gastronomia típicos da região alentejana, a sabedoria popular, as tradições locais e o folclore, isto é, lendas e crenças, como por exemplo, no século I d.C. em que se acreditava que ao ingerir bolotas era possível prever o futuro (Batista, 2017).

Acresce ainda que estas florestas de sobreiros e azinheiras contribuem para o sequestro de carbono e disponibilizam abrigo, habitat e alimento a inúmeras espécies (SE de suporte). Neste sentido, para além da relevância socioeconómica do Montado, este sistema mantém uma diversidade estrutural que suporta elevados níveis de biodiversidade (Bugalho *et al.*, 2011). Neste sentido, o seu papel na conservação da biodiversidade da paisagem do sul da Península Ibérica contribui igualmente para a sua designação como sistema de Elevado Valor Natural (Ferraz-de-Oliveira *et al.*, 2016; Paracchini *et al.*, 2008). O Montado, além de providenciar recursos alimentares, é também tido como um refúgio para diferentes animais, domésticos e silvestres, fatores que contribuíram para a candidatura, por parte de Portugal, da "Paisagem Cultural do Montado" Alentejano a Património Mundial da UNESCO em 2017.

Do ponto de vista ambiental, o Montado é sujeito à elevada variabilidade do clima Mediterrânico, semiárido, com uma precipitação desigualmente distribuída entre 400-700 mm, onde os solos da região são caracterizados na generalidade por serem pobres e ácidos. O Montado é considerado como uma paisagem cultural e incluído na Diretiva Habitat (Annex I 6310 "Dehesas" with evergreen *Quercus* spp.) e na Rede Natura 2000 ([www.natura.org](http://www.natura.org)). Em Portugal, foi estabelecido em 2011 um centro/sítio de investigação ecológica de longo-termo (Long Term Ecological Research - LTER) dedicado ao Montado (LTER Montado), que objetiva a compreensão do funcionamento deste sistema e das respetivas respostas a fatores ambientais, sociais e económicos.

A riqueza da biodiversidade do Montado tem sido foco de diversos estudos, os quais descrevem a presença de mais de 135 espécies por 0.1 ha, contabilizando-se a presença de insetos (*e.g.*, borboletas, escaravelhos), répteis (*e.g.*, sardão - *Lacerta lepida*, e largatixa - *Psammodromus algirus*), e mamíferos (*e.g.*, javalis - *Sus scrofa*, veado - *Cervus elaphus*, corço - *Capreolus capreolus*, texugo - *Meles meles* e espécimes de *Lynx pardinus*, uma das espécies de felinos mais ameaçadas no mundo) (Batista, 2017). Acresce ainda o facto de no Montado se verificarem cerca de 100 outras espécies listadas nos anexos das Diretivas Aves (Diretiva 2009/147/CE) e Habitats (Diretiva 92/43/CEE) da União Europeia. Este ecossistema único é igualmente um importante local de nidificação para espécies de aves ameaçadas (*e.g.*, águia imperial ibérica - *Aquila adalberti*, abutre-preto - *Aegypius monachus*, cegonha-preta - *Ciconia nigra*) (Batista, 2017). Apesar da reconhecida importância ecológica, esta informação não é percebida (e apreciada) pelo público em geral, pelo que se identifica a necessidade de transmitir este conhecimento às populações locais e turistas por forma a validar os esforços conservacionistas e a manutenção deste sistema produtivo.

As alterações climáticas são igualmente uma ameaça para o Montado e os impactos fazem-se sentir na definição das estações do ano que se caracterizavam por invernos chuvosos e verões quentes e secos. Na atualidade os crescentes níveis de aridez e escassez de água ameaçam a produtividade do Montado, a que acrescem ainda as alterações ao nível do solo – uso do mesmo, intensificação da erosão e frequência de incêndios. Estes fatores contribuem para um aumento do abandono de locais menos férteis por outros mais adaptados, acentuando a inadequada utilização do solo e da água. Apesar do agravamento destes fatores, o Montado é reconhecido como um sistema resiliente, com capacidade adaptativa a diferentes condições de stress (a)bióticos que enfrenta. De facto, o Montado, dada a sua biodiversidade e potencial socioeconómico, é considerada uma área crucial para a formação de zonas



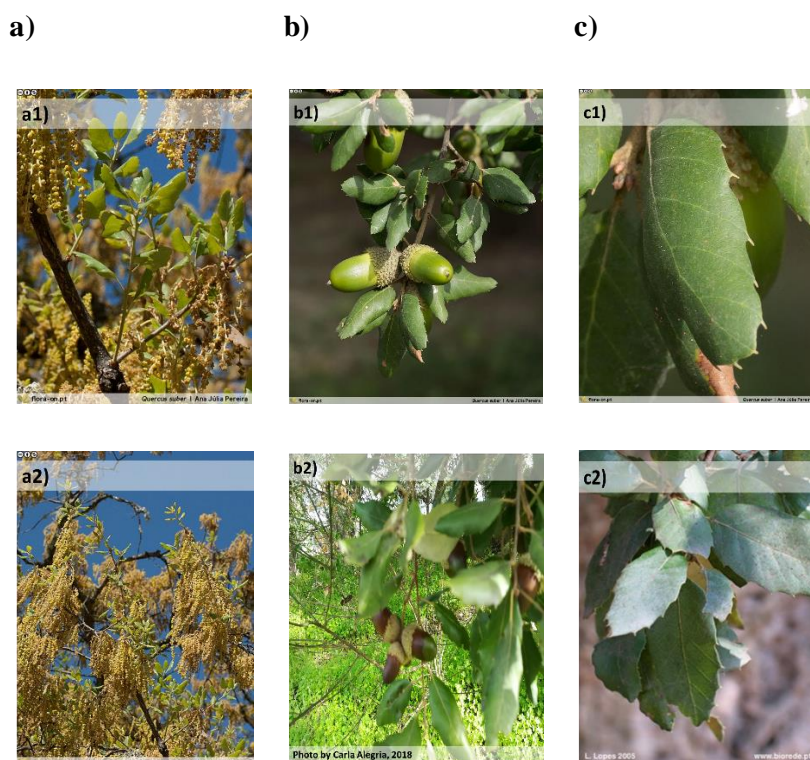
tampão à desertificação (SE de regulação) (Jongen, 2013; de Oliveira, 2014; Ferraz-de-Oliveira *et al.*, 2016; UNESCO/WHC, 2017).

Como referido, o Montado é caracterizado pela sua cobertura ser dominada por sobreiros (*Quercus suber*) e azinheiras (*Quercus rotundifolia*), pelo que se dedica dois subcapítulos a estas espécies, destacando-se as estratégias específicas de adaptação no contexto de alterações globais.

### 1.3.1.1 *Quercus suber* L.

O sobreiro, *Quercus suber* L., é uma angiospérmica dicotiledónea, perenifólia de folha larga pertencente ao género *Quercus*, ordem Fagales da família das Fagáceas. Trata-se de uma árvore de médio porte, de vida longa, e crescimento lento, com um diâmetro de 1.5 m e atingindo até 20-25 m de altura (Houston Durrant *et al.*, 2016; Paulo *et al.*, 2016).

É uma espécie monoica (flores masculinas e femininas) e floresce (Figura 1.2.a) desde fevereiro até maio/junho. A frutificação ocorre entre os 15 e 20 anos com periodicidade anual ou bianual, sendo os níveis de produtividade em bolota/lande (Figura 1.2.b) variável, assim como as suas dimensões. No sobreiro são produzidos três tipos de fruto, cada um com épocas distintas de amadurecimento: o 1º tipo, denominado de bastão, apresenta maiores dimensões e amadurece de setembro a outubro; o 2º, lande, são os frutos mais abundantes e valiosos, de forma alongada com cerca de 2 a 3 cm de comprimento, amadurecendo entre novembro e dezembro; o último, landisco, nem sempre chega a amadurecer, caracterizando-se por serem frutos imperfeitos e mais pequenos (de Oliveira, 2014; Houston Durrant *et al.*, 2016; de Rigo *et al.*, 2016; Passarinho *et al.*, 2019). As folhas (Figura 1.2.c) são classificadas como esclerofilas, de forma oval, com 4 a 7 cm de comprimento, e cuja face adaxial apresenta uma cor verde escura e a face abaxial uma tonalidade acinzentada.

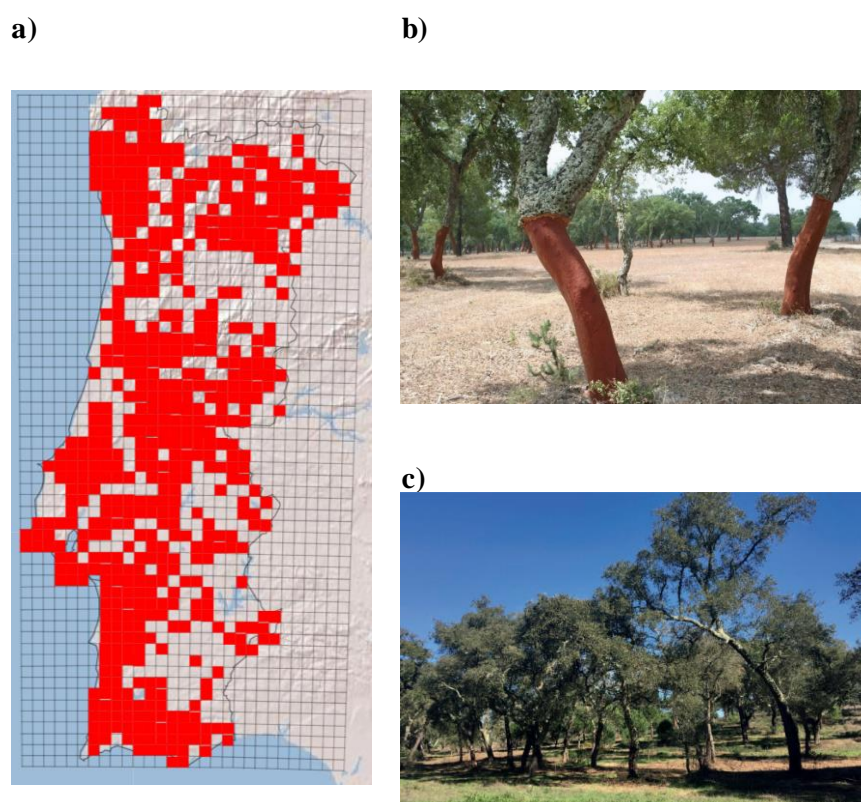


**Figura 1.2.** Detalhes fotográficos de *Q. suber*. **a)** Floração [a1 e 2 – Fotos de Ana Júlia Pereira; flora-on.pt]; **b)** Frutificação (bolota/lande) [b1 – foto de Ana Júlia Pereira; flora-on.pt; b2 – foto de Carla Alegria, 2018]; **c)** Folhas [c1 – foto de Ana Júlia Pereira; flora-on.pt; c2 – foto de L. Lopes, 2005; Biorede].



O *Q. suber* (QS) é uma espécie moderadamente tolerante, dominante em locais com influência atlântica, desenvolvendo-se em condições quentes húmidas e sub-húmidas, até uma altitude de 2000 m (altitude ótima de 600 m) (Paulo *et al.*, 2016), e temperatura média anual (TMA) ótima entre 13 °C e 16 °C, sendo tolerável a TMA de 19 °C e a uma temperatura média mínima do mês mais frio na ordem dos 4°-5 °C, sendo intolerante a temperatura inferior a -10 °C (Houston Durrant *et al.*, 2016). QS é uma árvore sensível à escassez de água (Melhorado e Moreira, 2007; Alegria *et al.*, 2019), embora mantenha a sua atividade metabólica ativa e funcional em anos onde se verificam uma baixa precipitação média anual (PMA), inferior a 400 mm (Paulo *et al.*, 2016). No entanto, é também sensível à elevada disponibilidade de água, nomeadamente em anos em que se verifica PMA superior a 1700 mm (Paulo *et al.*, 2016). Do exposto, Paulo *et al.* (2016) indicam que o intervalo de PMA mais favorável ao desenvolvimento de QS situa-se entre os 600 e os 800 mm.

As propriedades do solo afetam o desenvolvimento das raízes de QS. O sobreiro apresenta-se como dominante em zonas de solos siliciosos profundos, arejados, capazes de drenar água, com pH situado entre 5-7 e apresenta uma elevada sensibilidade à compactação do solo (Paulo *et al.*, 2016). No entanto, QS apresenta tolerância à maioria dos solos, com exceção dos de origem calcária, verificando-se até o seu estabelecimento em solos com baixo conteúdo em matéria orgânica e azoto, pobres e superficiais (Paulo *et al.*, 2016). Na Figura 1.3, apresenta-se o mapa da distribuição geográfica do sobreiro em Portugal continental, assim como alguns registos fotográficos desta árvore emblemática.



**Figura 1.3.** a) Distribuição geográfica de *Q. suber* (QS) em Portugal continental assinalada a vermelho (Carapeto *et al.*, 2020; Flora-on); b) Tronco de QS descortçado (ICNF - IFN6, 2019); c) Montado de Sobre (Passarinho *et al.*, 2019).

Como se observa na Figura 1.3a, a espécie QS encontra-se distribuída pelas florestas Mediterrâneas e bem integrada no Alentejo, a mesma ocupa cerca de 19% desta região, isto é, 609.4 mil ha, segundo dados de 2015 (ICNF, 2019; PORDATA), estimando-se uma produtividade anual em bolota/lande de 265 050 t, segundo a mesma fonte. QS observa-se como dominante junto da costa Atlântica, apresentando diversas estratégias de adaptação ao stress climático verificado nestas zonas. A

nível ecofisiológico, em situações de stress hídrico, situação coincidente com os meses mais quentes de verão, a desidratação é prevenida pelo fecho dos estomas (diminuição da transpiração) ou pela abscisão das folhas (Houston Durrant *et al.*, 2016). Ainda a nível foliar, sob défice hídrico, a estrutura dos cloroplastos sofre uma transformação marcada, incluindo não só irregularidade da sua forma, inchaço e rutura de tilacoides, como também o parênquima clorofiliano paliádico (clorênquima) mais espesso, conduzindo a um grande aumento da espessura da folha (Ja Kwak *et al.*, 2011). As plântulas que crescem perante este tipo de circunstâncias apresentam uma redução do rácio caule/raiz devido à estimulação do crescimento mais profundo das raízes, como estratégia de captação de maiores volumes de água, bem como um aumento da frequência estomática graças à sua plasticidade morfológica (Ja Kwak *et al.*, 2011). De forma idêntica, a redução do rácio caule/folha pode ocorrer quando estes carvalhos crescem sob luz solar extremamente baixa, verificando-se um aumento na área foliar específica e a diminuição da espessura do parênquima (Ja Kwak *et al.*, 2011). Na combinação de baixa luminosidade e stress hídrico moderado, a principal estratégia da planta para a manutenção do turgor é o ajuste osmótico, embora *Q. suber* apresente fraca aptidão para tal (Pardos *et al.*, 2004).

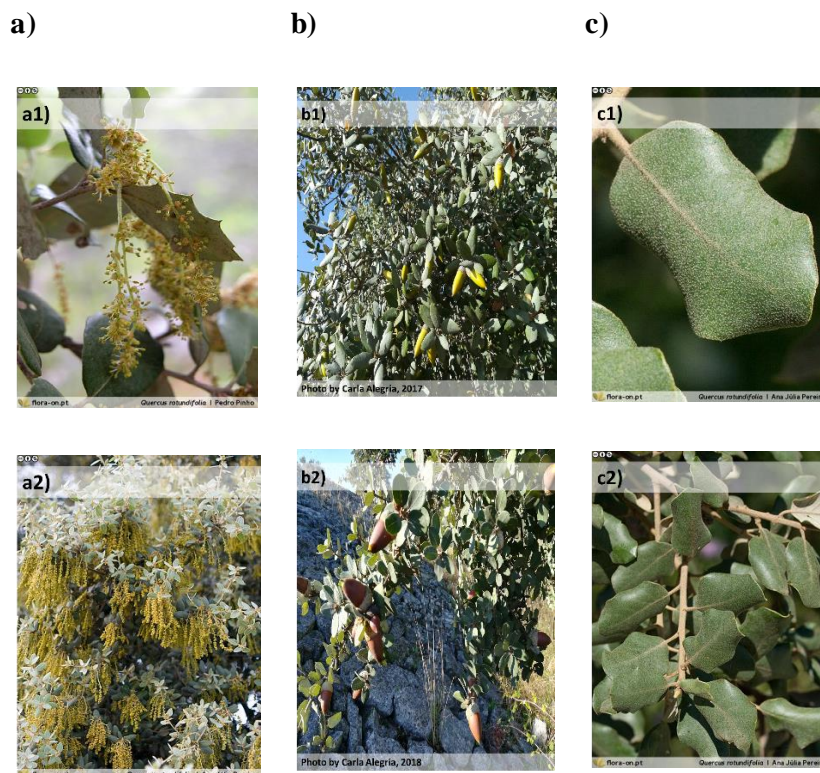
A nível da produção de cortiça, principal produto da exploração de QS, é necessária interferência (podas) para que esta apresente uma conformação desejável à obtenção de fuste único e cilíndrico com dimensões rentáveis. Neste sentido, é desejável que as podas em QS se iniciem em árvores jovens (1-1.5 m altura) e periodicamente para supressão de múltiplos ramos (Hubert e Courraud, 1994). De acordo com Natividade (1990), QS explorados para a produção de cortiça deverão possuir um fuste único com *ca* de 3 m, e uma copa desenvolvida em 2-3 ramificações de 1ª ordem, livres de ramos e ramificações de 2ª ordem, para que seja possível a extração de cortiça.

### 1.3.1.2 *Quercus rotundifolia* Lam.

À semelhança do sobreiro, a azinheira (*Quercus rotundifolia* Lam. = *Quercus ilex* L. subsp. *rotundifolia* Lam.; QR), é uma dicotiledónea perenifólia, com ciclo reprodutivo anual, pertencente às Fagáceas, sendo considerada a espécie mais abundante na floresta mediterrânica. As árvores podem atingir 8-12 (15) m de altura, com copa ampla, densa e arredondada.

QR é uma monoica que floresce entre maio e junho (Figura 1.4a), com crescimento de nova folhagem. Durante a floração, as pequenas flores femininas estão agrupadas (2 a 3 flores) num pedúnculo curto, na axila de uma folha pubescente, enquanto que as masculinas agrupam-se em densos amentos pendulares, com 4 a 7 cm de comprimento, abrindo-se depois em múltiplos estames amarelos (de Rigo *et al.*, 2016). Uma diferença entre QR e QS são os respetivos frutos (Figura 1.4b), em que, em QR, é inexistente o denso tapete de pelo que cobre o interior da casca (endocarpo). A frutificação ocorre entre outubro e fevereiro, sendo os níveis de produtividade variáveis assim como as dimensões da bolota. QR apresenta apenas uma época de amadurecimento dos frutos, de outubro até a dezembro. As folhas grossas esclerófilas das azinheiras (Figura 1.4c) têm a particularidade de apresentar o dobro da clorofila necessária para a realização da fotossíntese, concentrando os estomas na parte interior da folha (Ruiz de la Torre, 2006). Estas características apresentam-se como uma resposta adaptativa às condições climáticas, objetivando a minimização de perdas de água durante períodos secos e quentes. Além disso, as folhas apresentam uma camada de pelos ou ceras que refletem a luz solar e minimizam o aquecimento foliar nestes locais de forte exposição solar. Estas estruturas facilitam igualmente a manutenção de uma camada húmida nas superfícies foliares, contribuindo para minimizar as perdas de água e facilitar as trocas gasosas e a condutância estomática (Ruiz de la Torre, 2006). Salienta-se ainda que as folhas de QR apresentam diferenças morfológicas face à posição relativa na copa. Estas diferenças condicionam a exposição à radiação, onde se verifica o maior aquecimento das folhas mais exteriores no Verão, implicando o fecho dos estomas e a redução da transpiração. Estas folhas, por norma, apresentam uma lobulação que facilita a respetiva refrigeração e troca de calor. As folhas internas, com menores

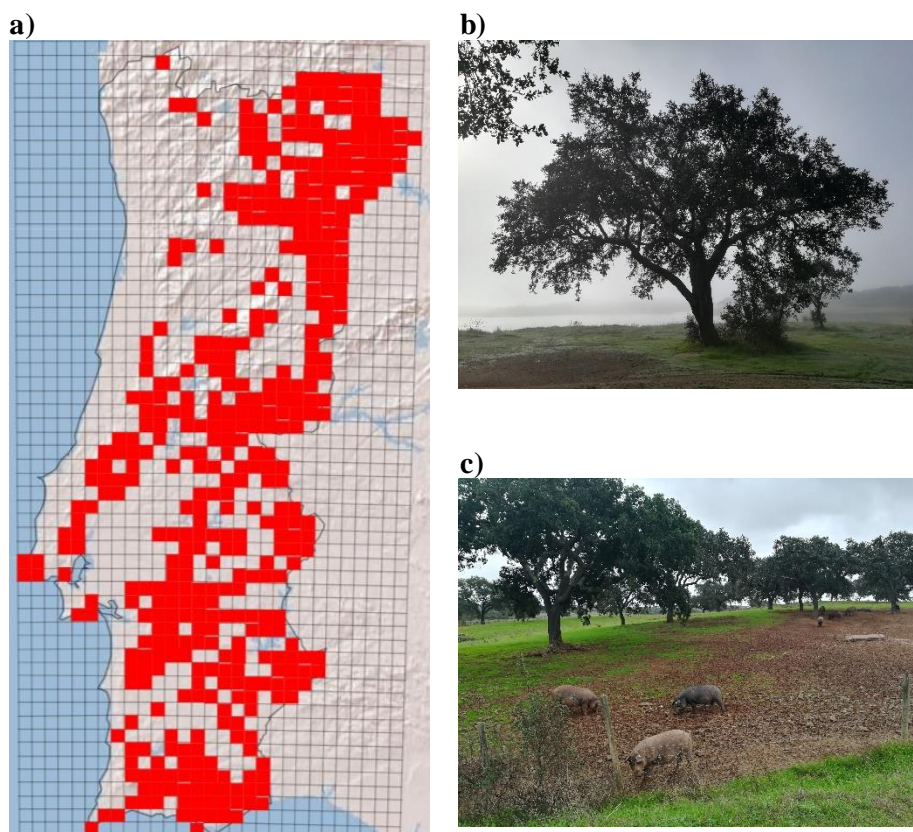
dimensões, apresentam bordas inteiras, são mais arredondadas e apresentam um menor revestimento isolador (Costa *et al.*, 1997).



**Figura 1.4.** Detalhes fotográficos de *Q. rotundifolia*. a) Floração [a1 – foto de Pedro Pinho; a2 – foto de Ana Júlia Pereira; flora-on.pt]; b) Frutificação (bolota) [b1 e 2 – fotos de Carla Alegria, 2017, 2018]; c) Folhas [c1 e 2 – fotos de Ana Júlia Pereira; flora-on.pt].

É frequente encontrar montados mistos de azinheira e sobreiro, no entanto, o QR destaca-se de QS pela sua elevada plasticidade e tolerância à seca, sendo por isso dominante em áreas de baixa PMA ( $\geq 300$  mm; LPN, 2007). O QR tem uma PMA ótima de 600 mm (Patón *et al.*, 2009), mas é capaz de sobreviver em regiões com PMA até 2000 mm (Jardim Botânico UTAD). Quanto à sua temperatura ótima, esta varia entre os 14 °C e os 18 °C (Petroselli *et al.*, 2013). A maior incidência QR verifica-se, na generalidade, nos grandes tipos de substratos siliciosos (exceto arenosos) e também, em solos de origem calcária ou com baixa capacidade de retenção de água, em oposição ao sobreiro. Tipicamente uma espécie Mediterrânica, QR é extremamente bem-adaptada à irregularidade na distribuição de precipitação, a temperatura baixa durante o Inverno, com resistência até -15 °C (Petroselli *et al.*, 2013), e coincidência do período máximo de seca com temperatura elevada durante o período de Verão (Costa *et al.*, 1997). Pela sua estratégia adaptativa a diferentes fatores climáticos, a distribuição de QR no Montado Alentejano é mais ampla que a verificada face ao QS, particularmente na região mais interior como se pode verificar na Figura 1.5, onde se apresentam igualmente alguns registos desta espécie.





**Figura 1.5.** a) Distribuição geográfica de *Q. rotundifolia* (QR) em Portugal continental assinalada a vermelho (Porto *et al.*, 2020; Flora-on); b) Azinheira isolada (foto de Carla Alegria, 2018); c) Montado de Azinho (foto de Carla Alegria, 2018).

O QR ocupa cerca de 10% da região do Alentejo (Figura 1.5a), isto é, 317.5 mil ha, segundo dados de 2015 (ICNF, 2019; PORDATA), prosperando em áreas com <400 m altitude. Esta representação apresenta uma tendência decrescente da respetiva área de ocupação face a inventários anteriores, correspondendo a uma diminuição na ordem dos 10 mil ha entre 2005 e 2015 (ICNF, 2019), possivelmente atribuída à ação indireta de agentes patogénicos (Pereira *et al.*, 1999; Pereira *et al.*, 2002). Independentemente desta tendência, a produção de bolota é elevada, correspondendo a uma média anual de 118 870 t (ICNF, 2019; PORDATA). No montado de azinho, a área de sob coberto é maioritariamente dedicada ao pasto (Figura 1.5c), com uma ocupação anual por varas de porco Alentejano nos meses onde a produção de bolota é máxima (período de montanheira, outubro-fevereiro), sendo esta a principal via de valorização da azinheira.

Tal como no sobreiro, a azinheira desenvolveu diversas estratégias de adaptação ao stress climático, nomeadamente para maximizar o uso dos recursos hídricos e dos nutrientes. Além da estratégia adaptativa da esclerofilia foliar que permite ajustar o período vegetativo mantendo o potencial hídrico baixo em períodos de escassez de água enquanto facilita as trocas gasosas (Werner *et al.*, 2001), a flutuação da taxa fotossintética ao longo do dia através do controlo estomático contribui não só para a minimização das perdas de água como também para a diminuição da fotossíntese. Esta regulação, fecho estomático do meio dia (*midday-closure*) (Tenhunen *et al.*, 1980), permite a verificação de máximos de atividade fotossintética (absorção de CO<sub>2</sub>) nas primeiras horas do dia, onde a temperatura é ainda relativamente baixa, e, à medida que a temperatura aumenta, regista-se um fecho dos estomas, prevenindo perdas de água e uma diminuição da atividade metabólica. Na continuação do dia, com a diminuição de temperatura, os níveis máximos de atividade metabólica são recuperados. Este mecanismo de regulação estomática foi primeiramente descrito por Tenhunen *et al.* (1980) noutra

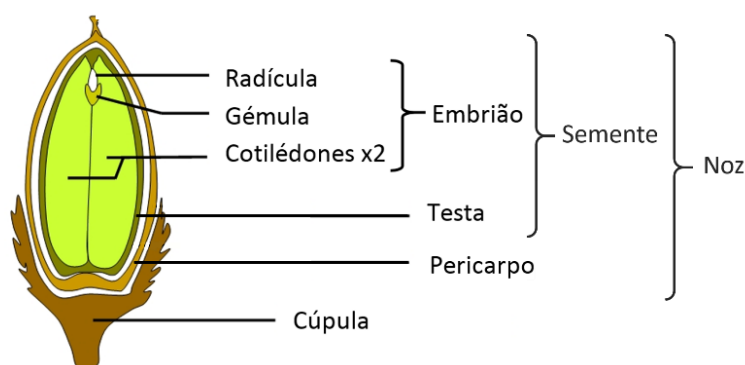
espécie tipicamente mediterrânica (*Arbutus unedo*, medronheiro), sendo posteriormente verificado tanto em QR como QS por Lange *et al.* (1982) e em QR por David *et al.* (2004), Mediavilla e Escudero (2004) e Melhorado e Moreira (2007). Esta estratégia evidencia a adaptação de QR a um uso eficiente da água, e demonstra a plasticidade desta espécie aos padrões sazonais (ocorre apenas quando a disponibilidade hídrica é insuficiente para a manutenção de uma taxa transpiratória suficiente).

## 1.4 Bolota: Aspectos Botânicos, Químicos e Ecofisiológicos

As bolotas apresentam, enquanto frutos do sistema EVN, uma vantagem competitiva na ótica da valorização alimentar por serem frutos livres de resíduos químicos, como pesticidas e herbicidas (Alegria, 2018; Alegria *et al.*, 2018). Além da sua utilização alimentar, as bolotas podem ainda ser utilizadas como indicadores do "status" do ecossistema em que se inserem. Por outro lado, a aridez molda os principais processos dos ecossistemas, como a produtividade primária e o ciclo dos nutrientes, atuando como um forte filtro ambiental para as comunidades de plantas (Delgado-Baquerizo *et al.*, 2013; Nunes *et al.*, 2017). As previsões das alterações climáticas apontam para um aumento geral da aridez, aumentando, em consequência, a vulnerabilidade das comunidades à seca (Huntington *et al.*, 2006; IPCC, 2007). Em resultado do aumento da aridez são expectáveis alterações na estrutura e composição da vegetação, bem como, na alteração das características funcionais dominantes do ecossistema (*e.g.*, anatómicas/morfológicas e fisiológicas). Em particular, salienta-se a influência das condições de aridez nas alterações do ciclo do carbono (C) e do azoto (N) enquanto processos biogeoquímicos chave no funcionamento do mesmo. Tendo em conta que o investimento das plantas em frutos/sementes pode ser influenciado pela respetiva adaptação ao *stress* hídrico e variáveis ambientais (Aguillera *et al.*, 2011; Rodrigues *et al.*, 2011a; Rodrigues *et al.*, 2011b) identificam-se para além dos aspetos botânicos e químicos, os principais mecanismos de adaptação associados à bolota.

### 1.4.1 Caracterização Botânica e Química

A bolota é morfologicamente classificada como uma noz de uma semente só, caracterizada pela ausência de endosperma e pela presença de um embrião aclorófilo. No corte longitudinal (Figura 1.6) é possível distinguir os diferentes constituintes da bolota, onde se destacam a cúpula e a noz. A cúpula escamada envolve entre 2/3 e 1/2 da noz e liga a noz ao pedúnculo da árvore. A noz é revestida pelo pericarpo (casca), camada externa lignificada que protege a semente, sendo a semente composta pela testa (membrana aveludada) e pelo embrião. Por sua vez, o embrião é constituído por dois cotilédones alargados que acumulam reservas e, no extremo oposto do pedúnculo, localizam-se a gémula e a radícula, as quais originam uma nova planta (de Oliveira, 2014; Vinha *et al.*, 2016).



**Figura 1.6.** Secção longitudinal de uma bolota. Adaptado de Vinha *et al.* (2016).

O sucesso reprodutivo *Quercus* spp. assenta principalmente na capacidade da bolota se dispersar e estabelecer, sendo importante considerar os fatores que influenciam este sucesso. Apesar de ser comum o recurso da classificação morfológica para agrupar as bolotas, fatores filogenéticos e ecológicos são responsáveis por diferenças entre as bolotas dos *Quercus*. Vários estudos foram já desenvolvidos para correlacionar as características morfológicas forma e tamanho com fatores ecológicos (e.g., variáveis edafo-climáticas, disponibilidade de água, tipo de vegetação) (Merouani *et al.*, 2003; Gea-Izquierdo *et al.*, 2006; Alegria *et al.*, 2019; Alegria *et al.*, 2020), no entanto, verifica-se uma elevada variabilidade no tamanho (comprimento, peso e diâmetro) dentro e entre espécies (Greenberg, 2000; Gea-Izquierdo *et al.*, 2006). A duração do período vegetativo pode também influenciar as diferentes dimensões e formas que a bolota pode tomar de planta para planta (Díaz-Fernández, 2000; Díaz-Fernández *et al.*, 2004), verificando que quanto mais cedo se dá a germinação e floração do indivíduo, maior será o tamanho da bolota. Por outro lado, verifica-se também variação nos níveis de produtividade das árvores, relacionada com a quantidade de recursos disponíveis (de Oliveira, 2014). Salienta-se que o tamanho de uma bolota está correlacionado positivamente com a taxa de sobrevivência das sementes sob condições de stress (Aizen e Woodcock, 1996), demonstrando que os *Quercus* apresentam plasticidade na morfologia e produtividade da bolota, consequente dos recursos ambientais e climáticos. Reforçando esta plasticidade, é descrito por Alegria *et al.* (2020) que quanto menor o índice de aridez, isto é, quanto mais árido o local, maior será o peso e o comprimento da semente. Esta correlação negativa evidencia uma estratégia de sobrevivência da parte da planta que, aquando em stress hídrico, investe no sucesso das suas sementes.

Quimicamente, a bolota pode ser descrita como um “alimento saudável” e com elevado valor nutricional. De uma forma geral, a principal fonte de energia são os hidratos de carbono, onde se destaca o amido como composto maioritário (48% a 50%) e, em menores concentrações, açúcares solúveis como a sacarose e a glucose (Vinha *et al.*, 2016). À semelhança dos hortofrutícolas, a bolota apresenta baixas concentrações de proteína. De acordo com Fernández *et al.* (2005), a quantidade em proteína varia entre 3.6% a 10.5%, enquanto Vinha *et al.* (2016) reporta valores entre os 2% a 5%. É igualmente de destacar a ausência de glúten. Este último aspeto representa uma vantagem para a produção de alimentos sem glúten (adaptada à dieta de celíacos) e que representa na atualidade um nicho de mercado em expansão.

Em relação à componente da gordura, a bolota apresenta teores variáveis na dependência da espécie, entre 2% e 30% (Vinha, *et al.*, 2016; Passarinho *et al.*, 2019). Outros fatores que influenciam o teor de gordura do fruto são: o tipo de solo, estado fitossanitário e variáveis climáticas. Focando nas espécies em estudo, o sobreiro apresenta menores teores em gordura, 4.6%-8.6%, enquanto a azinheira apresenta em média, quantitativos superiores, entre 7.2%-16.5% (Vázquez, 1998). Quanto ao perfil de ácidos gordos, o ácido oleico, o palmítico e o linoleico são os mais representativos na bolota. No entanto, a presença de ácidos gordos minoritários pode ser usada como ferramenta para distinguir bolotas de diferentes espécies, como uma impressão digital (Ferreira Dias *et al.*, 2003; de Oliveira, 2014; Vinha *et al.*, 2016).

Ao nível dos micronutrientes, destacam-se os quantitativos em ferro, cobre, zinco e manganês (de Oliveira, 2014; Vinha *et al.*, 2016) e em vitaminas, nomeadamente a provitamina A e a vitamina E. Assinala-se que o quantitativo em provitamina A é suficiente para satisfazer a dose diária recomendada para adultos (900 µg; 3 000 UI) apenas com a ingestão de uma única bolota (Vinha *et al.*, 2016). Também são encontrados elevados quantitativos de vitamina E, principalmente  $\alpha$ - e  $\gamma$ -tocoferol, onde a concentração em  $\gamma$ -tocoferol é cerca de 4.6 a 8.7 vezes superior à de  $\alpha$ -tocoferol. Os álcoois alifáticos como o tetracosanol, bem como esteróis, 90% dos quais são  $\beta$ -sitosterol, apresentam concentrações superiores às encontradas em alimentos como amêndoas, soja, azeitonas, pistachos e óleos de pinho, e semelhantes às encontradas em sésamo e óleo de milho (Vinha *et al.*, 2016).

A bolota caracteriza-se pela presença de uma grande diversidade de compostos fenólicos, (quantitativa e qualitativamente) de carácter antioxidante. Estes compostos participam em múltiplas

funções fisiológicas, biológicas e bioquímicas, desempenhando um papel importante na dieta humana, nomeadamente na manutenção dos níveis adequados de antioxidantes que atuam na produção e neutralização de espécies reativas de oxigénio (ROS), azoto (RNS) e de enxofre (RSS). Esta ação é muito importante na prevenção da doença cardiovascular, cancerosa e no combate ao envelhecimento, considerando que os compostos fenólicos apresentam uma estrutura química ideal para a atividade sequestradora de radicais livres, reunindo as propriedades necessárias para definir um antioxidante, nomeadamente reatividade como um agente doador de hidrogénio / electrão e o potencial transiente de quelação de metais (Rice-Evans *et al.*, 1997; Kris-Etherton *et al.*, 2002; Belkaid *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2009; Tsao, 2010). Apesar da variabilidade entre as espécies, os ácidos fenólicos (principalmente gálico, elágico e compostos derivados), flavonóides (flavan-3-ols) e taninos são ubíquos em todas as espécies de *Quercus*. Além da espécie, outros aspetos genéticos, ecofisiológicos, composição do solo, condições climáticas e origem geográfica, contribuem para a variabilidade do perfil fenólico da bolota (Vinha *et al.*, 2016). Independentemente desta variabilidade, a elevada capacidade antioxidante associada aos fenólicos presentes nas bolotas, perspetivam a respetiva utilização como alimento e/ou ingrediente funcional (elevada bioatividade) com diferentes aplicações industriais.

Na Tabela 1.1, resumem-se os resultados de um estudo relativo à composição nutricional e fenólica e que destaca as diferenças entre a bolota de sobreiro e a de azinheira do Montado Alentejano.

**Tabela 1.1.** Composição (g/100 g) nutricional e fenólica de bolota de azinheira (*Q. rotundifolia*) e de sobreiro (*Q. suber*) colhidas em Portugal. Adaptado de Oliveira *et al.*, 2012.

Composição	<i>Quercus rotundifolia</i> (g/100 g)	<i>Quercus suber</i> (g/100 g)
Proteína	2.26	4.08
Lípidos	6.40	3.21
Amido	30.80	21.01
Cinzas	1.25	1.36
Taninos	3.81	7.34
Fenóis totais	3.97	7.52

## 1.4.2 Caracterização Ecofisiológica

Sob influência de diferentes condições ambientais, as plantas podem adotar uma combinação diferencial de características para maximizar seu desempenho fisiológico (Díaz e Cabido, 2001; Violle *et al.*, 2007; Lopez-Iglesias *et al.*, 2014; Pérez-Ramos *et al.*, 2019). Em resposta às alterações ambientais, as plantas alteram as suas características funcionais, como as morfológicas e fisiológicas, refletindo padrões de aquisição e alocação de recursos e estratégias específicas de adaptação (Maire *et al.*, 2013a; Maire *et al.*, 2013b; Volis e Bohrer, 2013; Abdala *et al.*, 2018). De acordo, as respostas fisiológicas relacionadas, por exemplo, com a aclimação à seca refletem-se nas características quer das folhas quer das sementes (Galle *et al.*, 2011), pelo que a sua avaliação é de extrema importância.

As características morfológicas da semente contribuem para a compreensão das respostas da planta às condições ambientais, em que se verifica que o tamanho da semente é correlacionado com a capacidade de recrutamento (pela capacidade de fornecer uma maior quantidade em nutrientes às futuras plântulas; Metz *et al.*, 2010) e adaptação da planta às condições ambientais (Hernández *et al.*, 2010; Volis e Bohrer, 2013). Encontram-se na literatura estudos focados na correlação entre as características morfológicas da bolota (forma e tamanho) e diferentes fatores ecológicos (*e.g.*, variáveis edafoclimáticas, disponibilidade de água e tipo de vegetação) (Merouani *et al.*, 2003; Gea-Izquierdo *et al.*, 2006). No entanto, existe uma grande variabilidade no tamanho da semente dentro e entre as espécies

de *Quercus* (Greenberg, 2000; Gea-Izquierdo *et al.*, 2006), podendo esta variabilidade ser resultado de fatores genéticos dos indivíduos, do clima, do solo ou da estrutura do coberto arbóreo. Como exemplo, em bolotas de sobreiro e de azinheira, Carborenro *et al.* (2003) e Díaz-Fernández *et al.* (2004) identificaram uma elevada variabilidade entre indivíduos em relação ao tamanho e peso. Apesar disso, foi demonstrado que o tamanho da bolota está positivamente correlacionado com a duração do seu período de desenvolvimento (Díaz-Fernández *et al.*, 2004) e com a precipitação/aridez (Alegria *et al.*, 2020).

A avaliação dos processos químicos, físicos e metabólicos relativos ao carbono e ao azoto pode ser realizada pela análise da composição isotópica em carbono e azoto ( $\delta^{13}\text{C}$ ,  $\delta^{15}\text{N}$ ) (Werner *et al.*, 2012; Carvalho *et al.*, 2020). Estas respostas são indicativas das alterações das características fisiológicas relacionadas com a regulação da perda de água, fixação de carbono (C) e aquisição de azoto (N) que, por sua vez, influenciam a capacidade de estabelecimento, desempenho e de resposta das plantas a stresses ambientais (Lopez-Iglesias *et al.*, 2014). De facto, vários estudos em ecossistemas Mediterrâneos demonstram que os isótopos estáveis de C e N são ferramentas úteis para abordar as respostas ecofisiológicas das plantas a stresses ambientais, como a seca (Máguas *et al.*, 2011; Antunes *et al.*, 2018), temperatura e precipitação (Ogaya e Peñuelas, 2008).

A assinatura  $\delta^{13}\text{C}$  foliar é considerada um indicador da eficiência do uso da água pela planta e das interações planta-ambiente (Donovan e Ehleringer, 1994; Diefendorf *et al.*, 2010), sendo também considerada como um marcador ecológico que viabiliza a compreensão de atributos fenológicos, estruturais e fisiológicos (Werner e Máguas, 2010). Já a assinatura  $\delta^{15}\text{N}$  foliar é tida como um marcador dos padrões de uso do azoto, pelo fracionamento de  $^{15}\text{N}$  e  $^{14}\text{N}$  durante os processos do ciclo do azoto (Robinson, 2001; Carvalho *et al.*, 2020). A variação dos valores de  $\delta^{15}\text{N}$  em plantas e solos pode estar ligada a vários fatores, como grupos funcionais de plantas (Evans, 2001), clima (Amundson *et al.*, 2003), associações micorrízicas (Mayor *et al.*, 2009), azoto e dinâmica do carbono (Schulze *et al.*, 1999) e deposição antropogénica de N (Pardo *et al.*, 2006). A composição elementar em C e N são características ecológicas importantes, onde o conteúdo em C relaciona-se com a capacidade de atividade fotossintética (Dietze *et al.*, 2014; Martínez-Vilalta *et al.*, 2016) e o conteúdo em N com a disponibilidade de azoto para a planta (Wergere Hirose, 1991).

De igual forma, as composições isotópicas e elementares das sementes podem ser usadas como indicadores de resposta às condições ambientais. A composição isotópica de C e N das sementes é relacionada com os padrões de captação e alocação de C e N, eficiência de uso da água e do azoto e uso das fontes de C e N (Hannachi *et al.*, 1996; Rodrigues *et al.*, 2013). Consequentemente, os rácios  $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$  das sementes podem ser tidos como indicadores das condições ambientais e das respostas específicas ao clima (*e.g.*, quantidade de precipitação, aridez) (Alegria *et al.*, 2020). Já as variações no conteúdo em C e N da semente podem resultar de diversas oscilações, como das variações no suprimento de azoto a partir do solo ou a partir de outros órgãos da planta, que são indicativas das dinâmicas de alocação destes elementos (Lutze e Gifford, 1998; Davies *et al.*, 2000).

Alegria *et al.* (2019) estudaram o potencial uso de bolotas para avaliar respostas de adaptação de *Quercus* ao aumento da seca. Neste estudo foi verificado que as bolotas das espécies QS e QR respondem a diferentes fatores, não só em relação ao gradiente climático, mas também a fatores locais. Foi demonstrado que as características isotópicas da bolota de sobreiro foram mais integradoras de fatores climáticos de longo prazo, especialmente devido à correlação negativa entre os valores de  $\delta^{15}\text{N}$  e conteúdo em N com a precipitação anual. Estas relações sugerem ainda que existe um investimento de QS nas sementes (bolotas) para compensar solos pobres (disponibilidade de nutrientes no solo). Quanto à azinheira, as assinaturas isotópicas da bolota foram mais integradoras de fatores topográficos e edáficos locais, onde o declive do terreno influenciou significativamente os valores de  $\delta^{15}\text{N}$  (enriquecimento em  $^{15}\text{N}$  em declives superiores), possivelmente relacionados com a lixiviação de nutrientes e escoamento de N do solo. A ligação entre a isothermalidade e os valores  $\delta^{13}\text{C}$  de QR refletiu



um enriquecimento de  $^{13}\text{C}$  quando as variações de temperatura diurnas são menores que as variações de temperatura anuais, sendo indicativo de que variações na isothermalidade poderão influenciar, por exemplo, a dinâmica de captação/alocação de C e/ou impactar a eficiência do uso da água.

## 1.5 Potencialidades de Valorização da Bolota

A bolota foi sempre reconhecida pela sua importância na economia rural, quer na componente de alimentação humana como animal. A sua utilização remonta a tempos ancestrais, 5000 anos atrás, designadamente na produção de farinhas e pão (Batista, 2017). Estas utilizações persistiram desde a Idade do Ferro até à atualidade, sendo utilizada como alimento de primeira necessidade, aquando do racionamento de cereais durante a 2ª Guerra Mundial. No entanto, após a introdução de trigo na Península Ibérica, a partir do Crescente Fértil, deu-se preferência a este cereal na produção de farinhas e pão (Passarinho *et al.*, 2019).



**Figura 1.7.** Usos tradicionais de bolota. **a)** Óleo de bolota [Fonte: Forager's Harvest] **b)** Pão de mistura à base de farinha de bolota de azinheira (um terço) e de farinha de trigo (dois terços) [Fonte: Moinho de Pisões]. **c)** Farinha de bolota [fonte: Centro Ciência Viva da floresta, Proença-a-Nova].

Em Portugal, a utilização da bolota na alimentação é muito diversificada, existindo um grande número de receitas tradicionais que compreendem a sua utilização. O surgimento de novos produtos à base de bolota de fabrico semi-artesanal é um exemplo recente de valorização deste fruto. Neste contexto, salientam-se alguns produtos que na atualidade são produzidos e comercializados localmente na Herdade do Freixo do Meio, tais como: melada de bolota, bolachas e broas, infusão (chá) de bolota, enchido vegetal, hambúrguer e patê de bolota (Figura 1.7) (Herdade do Freixo do Meio, 2020). É do conhecimento generalizado que nas aplicações culinárias dá-se preferência à utilização de bolota de azinheira porque os frutos são sensorialmente mais apelativos do que os de sobreiro. Este facto prende-se com a menor concentração de taninos que conferem ao fruto uma menor adstringência em que prevalece a perceção do sabor doce (Duodu *et al.*, 2003). Faz-se notar que os taninos podem ser parcialmente eliminados, submetendo a bolota a pré-tratamentos de lixiviação ou cozimento (Vinha *et*

al., 2016). A bolota, continua, contudo, a ser utilizada tradicionalmente no Montado Alentejano, desempenhando um papel importante na alimentação e engorda do porco Alentejano, em montanha. Salienta-se que a utilização de bolota na alimentação do porco ibérico é amplamente reconhecida como um importante contributo para melhorar a qualidade da carne (ao nível dos tecidos adiposos, hepáticos e musculares), produzindo um tipo de carne dita "mais saudável" na medida em que se promove a diminuição de ácidos gordos saturados (Cantos *et al.*, 2003). Ainda que com uma expressão marginal, a bolota é igualmente utilizada para a engorda de outras espécies pecuárias em regime extensivo.

As estimativas apontam para que, em Portugal, quantidades expressivas de bolota sejam desperdiçadas anualmente (ca de 55%) (Sottomayor, 2015). Neste contexto o desenvolvimento de estratégias de valorização da bolota deve ser entendido como investimento para o desenvolvimento económico local e para o fortalecimento da sustentabilidade do sistema produtivo. De facto, o desenvolvimento de produtos à base de bolota deve responder ao conceito de segurança alimentar definido pela Cimeira Mundial sobre a Segurança Alimentar (WSFS, 2009), destacando o acesso da população global a alimentos seguros e nutritivos, como é a bolota, que satisfaz as preferências alimentares e requisitos dietéticos essenciais, promovendo um estilo de vida ativo e saudável.

### 1.5.1 Composição Nutricional e Funcional

Para fins alimentares, salienta-se ao nível da composição química da bolota, a preponderância do amido (mais de 50% do seu miolo) entre outros hidratos de carbono, a presença de fibras, de proteínas e de vitaminas (principalmente A e E) (Saffarzadeh *et al.*, 1999; Gea-Izquierdo *et al.*, 2006; Rosenberg 2008). Em particular, as características do amido de bolota, conferindo uma elevada consistência final às massas, permitem alargar o espectro de aplicações desta matéria-prima de baixo custo, no domínio do desenvolvimento de novos ingredientes alimentares, designadamente de agentes espessantes e estabilizadores de interesse industrial diversificado (Correia *et al.*, 2013).

A composição química da bolota depende da diversidade filogenética, bem como de fatores ambientais extrínsecos, incluindo a composição do solo, clima, e origem geográfica (Tejerina *et al.*, 2011). Por conseguinte, estas variáveis são determinantes na qualidade do fruto e devem ser consideradas para a definição das diferentes aptidões de uso. Neste sentido existem inúmeros estudos comparativos dedicados à caracterização da composição química de bolota em função desses fatores. No estudo de caracterização de duas variedades de bolota (*Q. ilex* e *Q. rotundifolia*) realizada no por Afazal-Raffi *et al.* (1992) foi demonstrada a influência da origem geográfica (Espanha e Itália) na composição química do fruto, tendo-se concluído que as bolotas com origem espanhola possuem teores proteicos e lipídicos mais elevados. Por outro lado, no estudo de Aguilera *et al.* (2002) conclui-se que duas variedades de bolota (*Q. rotundifolia* e *Q. suber*) com a mesma proveniência geográfica (Espanha) apresentaram teores proteicos semelhantes. Outros estudos têm demonstrado que o teor de gordura das bolotas é muito variável consoante as variedades, tendo sido contabilizados teores na gama de variação de 2% a 30% (Ofcarcik *et al.*, 1971; Rababah *et al.*, 2008).

Para além da variabilidade filogenética, o clima e a composição do solo (incluindo a microbiota) foram igualmente considerados fatores influentes na qualidade do fruto refletindo-se ainda nos atributos sensoriais e nutricionais. Num estudo de caracterização de variedades de bolota (*Q. suber*, *Q. ilex*, *Q. faginea* e *Q. pyrenaica*) ao longo das estações do ano, foram observadas diferenças na composição química, tendo-se concluído que os níveis mais elevados de proteína e gordura foram obtidos em frutos colhidos na Primavera e no Outono, respetivamente, sem denotarem variações no teor em fibras. A composição em macro e micronutrientes minerais (Ca, Mg, P, K e Fe, Cu, Zn, e Mn, respetivamente) entre variedades pode ser igualmente muito variável (Rakic *et al.*, 2006).

Por outro lado, estudos de caracterização da fração lipídica e respetivo perfil em ácidos gordos da bolota, nomeadamente no que respeita aos ácidos gordos prevalentes (ácidos oleico, palmítico e

linoleico) têm despertado muito interesse na ótica do consumo humano e na alimentação animal (Gea-Izquierdo *et al.*, 2006; Tejerina *et al.*, 2011).

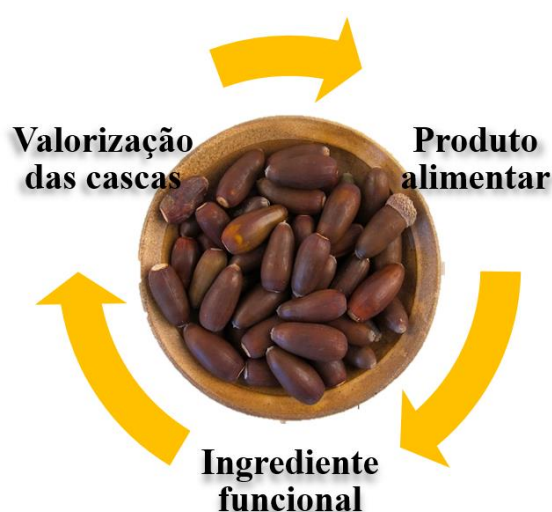
Relativamente ao teor vitamínico da bolota, destaca-se a importância dos teores caracterizados de vitamina E ( $\alpha$ - e  $\gamma$ -tocoferol) (Gea-Izquierdo *et al.* (2006) e de provitamina A (Bainbridge. 2001). Igualmente relevantes são os teores elevados de esteróis na bolota (em que o  $\beta$ -sitosterol é o predominante) (Rabhi *et al.*, 2016) em comparação com outras proveniências (óleos de amêndoa, soja, azeitona, pistácio e pinheiro) (Abidi, 2001; Phillips *et al.*, 2005; Nasri *et al.*, 2007).

Em suma, os indicadores nutricionais e bioativos anteriormente mencionados demonstram que a bolota apresenta um potencial bioativo / funcional valioso que justifica a motivação de muitos investigadores na procura de múltiplas valências de valorização. Estas abordagens, inserem-se no domínio da exploração de variedades ‘selvagens’ com a finalidade de desenvolver alimentos e ingredientes funcionais inovadores e/ou de suplementos dietéticos que representa na atualidade uma importante área da investigação em expansão.

## 1.5.2 Valorização Alimentar e Aptidão Tecnológica

A valorização deste fruto pode contribuir para o desenvolvimento de produtos ou de ingredientes alimentares de valor acrescentado especialmente numa ótica de valorização holística. Esta abordagem considera a utilização de todos os componentes do fruto bem como diferentes finalidades de aplicação: obtenção de farinhas, bebidas de infusão sucedâneas ao chá e café, óleo ou como matriz para a extração de compostos de interesse.

O elevado teor em amido e as suas características reológicas, como as propriedades de emulsificação e gelificação (Correia *et al.*, 2009; Correia, 2011; Korus *et al.*, 2015), apontam para a exploração do amido de bolota como ingrediente alimentar, nomeadamente como agente espessante e estabilizante. No âmbito da utilização da bolota como matriz e extração salienta-se o perfil fitoquímico em antioxidantes, destacando-se a presença de diferentes compostos fenólicos, não só presentes na semente como na casca (co-produto mais abundante na transformação da bolota). O teor em gordura e o perfil de ácidos gordos, maioritariamente insaturados, perspetivam igualmente a exploração como óleo alimentar, podendo este ser obtido de forma complementar à produção de farinhas. Deste modo completa-se um possível circuito de valorização da bolota, atendendo a uma estratégia de valorização global, como se demonstra na Figura 1.8, desde um produto alimentar, ingrediente funcional até à valorização de co-produtos (Alegria, 2018; Giovanetti *et al.*, 2018).



**Figura 1.8.** Estratégia de valorização da bolota (adaptado de Alegria (2018) e Giovanetti *et al.* (2018)).

### 1.5.2.1 Farinha de Bolota

A moagem da bolota para produção de farinhas corresponde a uma das principais utilizações deste fruto tendo em conta que o amido é o principal componente da bolota (Rababah *et al.*, 2008). A operação de moagem pode ser realizada nos frutos em fresco ou após a sua secagem, no entanto, a conservação da farinha na primeira situação pode ver-se dificultada devido ao teor de humidade elevado (cerca de 18%) (Correia *et al.*, 2009).

Uma característica diferenciadora da farinha de bolota é, como referido anteriormente, a ausência de glúten, fator importante que a distingue enquanto matéria-prima para o desenvolvimento de produtos de panificação para celíacos (Korus *et al.*, 2015). Outra das características interessantes da farinha de bolota refere-se à composição em fibras e à presença de minerais (P, K, Ca e Mg), que não existem na farinha de trigo (Rakic *et al.*, 2006; Jawarmeh *et al.*, 2013; Rashid *et al.*, 2014) o que a tornam mais interessante do ponto de vista funcional /bioativo.

A composição mais diversificada da farinha de bolota, justifica a sua utilização como matéria-prima alternativa para o desenvolvimento de produtos de panificação e tem sido alvo de muitos estudos (O'Shea *et al.*, 2014; Capriles *et al.*, 2016; Naqash *et al.*, 2017; Beltrão Martins *et al.*, 2020).

Salienta-se que a presença de glúten nas farinhas é responsável pelo desenvolvimento de características viscoelásticas da massa favoráveis, em que a cozedura sem glúten impõe dificuldades tecnológicas adicionais, nomeadamente a perda de muitas qualidades físicas em termos de textura, miolo, crosta e cor, sensação na boca, sabor, volume específico e prazo de validade (Matos *et al.*, 2015; Skendi *et al.*, 2018). Neste sentido, a substituição do glúten no fabrico destes produtos, pela adição parcial de farinha de bolota, representa um desafio tecnológico no qual se têm de otimizar a proporção de mistura dos diferentes ingredientes e matérias-primas, com vista a superar essas limitações. Com efeito, a investigação da farinha de bolota enquanto matéria-prima alternativa no fabrico de produtos sem glúten tem sido alvo de estudos nos quais se procuram estabelecer determinadas percentagens de incorporação que permitam otimizar a textura, os perfis sensoriais, nutricionais e antioxidantes dos produtos finais (Korus *et al.*, 2015; Korus *et al.*, 2017; Skendi *et al.*, 2018), nomeadamente em produtos de panificação (pão, bolos e biscoitos).

Mais recentemente, são conjecturadas outras estratégias de incorporação de farinha de bolota, nomeadamente em produtos que contêm glúten. Nestes casos, a adição de farinha de bolota ao pão tem por objetivo desenvolver uma cozedura inovadora e melhorar o perfil nutricional e funcional dos produtos (Svec *et al.*, 2018; Pasqualone *et al.*, 2019).

De todos estes estudos tem-se concluído genericamente que, até um certo nível, a adição de farinha de bolota desempenha um impacto positivo sobre as características pretendidas no produto final, nomeadamente no aumento da sua componente funcional / bioativa (Morais *et al.*, 2013; O'Shea *et al.*, 2014; Matos e Rosell 2015; Beltrão Martins *et al.*, 2020).

### 1.5.2.2 Óleo de Bolota

O fruto da bolota em natureza, pode ser utilizado para a extração de óleo edível com boa qualidade nutritiva e funcional, cujas características tal como a cor, o índice refrativo, o coeficiente de extinção de UV, os valores de saponificação e a iodina são comparáveis ao do azeite.

O teor de gordura da bolota depende das variedades de *Quercus*. De uma forma geral, as variedades brancas apresentam teores que não excedem 12% (*e.g.*, *Q. rotundifolia*, *Q. suber* e *Q. ithaburensis*) (Cantos *et al.*, 2003; Rababah *et al.*, 2008), no entanto, nas variedades de bolota preta e vermelha foram reportados valores de cerca de 30% (*e.g.*, *Q. marilandica* e *Q. falcata*) (Ofcarcik *et al.*, 1971). Vários estudos têm demonstrado a potencialidade do óleo de bolota como óleo alimentar, sendo

comparável ao azeite no que se refere ao sabor e benefícios nutricionais (Ferreira-Dias *et al.*, 2003; Al-Rousan *et al.*, 2013;).

A composição em ácidos gordos do óleo de bolota de *Q. suber* e *Q. ilex* L. é semelhante à do óleo de *Pistacia lentiscus* bem como de outros óleos de origem vegetal, tais como o óleo de girassol, amendoim, algodão, azeitona e abacate (Charef *et al.*, 2008).

De entre os compostos lipofílicos, salientam-se como os principais ácidos gordos na bolota, os ácidos oleico, palmítico e linoleico (Gea-Izquierdo *et al.*, 2006; Tejerina *et al.*, 2011). Porém, os perfis de ácidos gordos dos óleos de bolota obtidos de diferentes espécies de *Quercus* denotam uma grande variação na percentagem de ácidos gordos saturados, monoinsaturados e polinsaturados detetados em menor quantidade.

A bolota é uma fonte natural de ácido oleico neutro e contém elevadas quantidades de ácido  $\alpha$ -linolénico o que é de extrema importância na alimentação humana, promovendo a diminuição dos triglicéridos do soro sanguíneo e o aumento dos níveis de colesterol HDL. Para além dos efeitos benéficos para a saúde a composição específica de ácidos gordos insaturados, pode igualmente ser utilizada como impressão química digital para distinguir variedades de *Quercus*. Outro componente importante no óleo de bolota refere-se à presença de esteróis onde foram caracterizadas percentagens elevadas de  $\beta$ -sitosterol, bem como de pequenas quantidades de campesterol, estigmasterol, clerosterol, 5-avenasterol, 5,24-estigmastadienol, 7-estigmastenol, e 7-avenasterol (Rabhi *et al.*, 2016). Estes fitoesteróis, consumidos na dieta diária ou como aditivo alimentar, são importantes para reduzir os níveis de colesterol no sangue (Ostlund e Lin, 2006), bem como por serem moléculas biologicamente ativas na prevenção de outras doenças (Barreira e Ferreira 2015). Por fim, a presença de álcoois alifáticos (tetracosanol) no óleo de bolota (Rabhi *et al.*, 2016) pode ser explorada em diversas aplicações industriais. Estes compostos podem ser utilizados pelas suas propriedades emulsionantes, emolientes e espessantes, quer em produtos alimentares quer em produtos cosméticos. Aos álcoois alifáticos são ainda associadas atividade antimicrobiana e antitumoral (Volin 2001; Hilmarsson *et al.*, 2007).

## 2 Objetivos

O presente estudo teve como principal objetivo a promoção da valorização da bolota como um produto alimentar sustentável da paisagem do Montado, de Elevado Valor Natural. Neste sentido, pretendeu-se avaliar a influência do efeito espécie e o impacto do gradiente de aridez e das condições bioclimáticas e ambientais verificados na região do Alentejo na qualidade físico-química e fenólica, assim como nas respetivas assinaturas isotópicas da bolota de duas espécies de *Quercus*, *Q. rotundifolia* (QR) e *Q. suber* (QS). Para atingir estes objetivos, foram avaliados diferentes parâmetros morfológicos, químicos e ecofisiológicos da bolota QR e QS para: (i) validar o potencial da bolota como fonte alimentar alternativa atendendo aos fatores espécie e origem geográfica; (ii) identificar potenciais vias de valorização como matriz de extração de compostos de interesse económico, e; (iii) como indicador da performance do ecossistema de Elevado Valor Natural em que se inserem, o Montado.

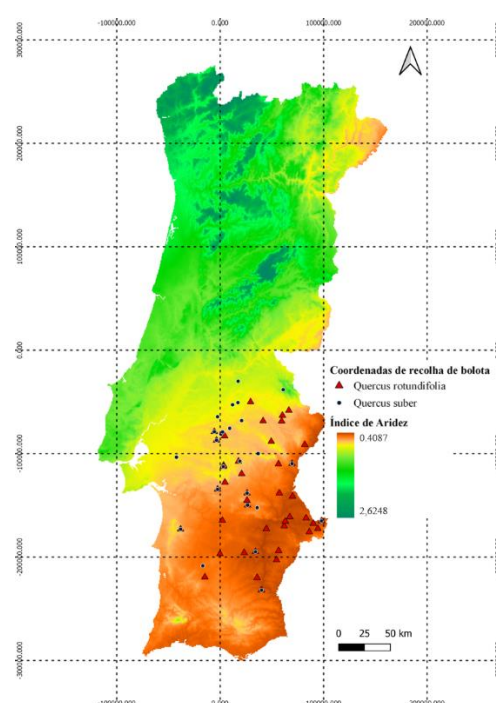
Inicialmente, eram também objetivos deste trabalho a avaliação do efeito do processamento alimentar (secagem/moagem) na qualidade nutricional e funcional das farinhas de bolota como matéria-prima/ingrediente nutritivo e saudável, e a definição de potenciais rotas de valorização das cascas de bolota, co-produto de processamento, como fonte de extração de compostos bioativos de interesse.

Estes estudos foram, no entanto, comprometidos face à atual situação pandémica (COVID-19) e quarentena imposta, que impossibilitou a realização dos ensaios de secagem da bolota e obtenção de farinhas, programados entre fevereiro e maio de 2020. Após a fase de contenção, foi verificado que a bolota adquirida para estes estudos (50 kg; Herdade do Freixo do Meio, Foros de Vale de Figueira, Montemor-o-Novo), conservada a  $0^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$  (Fitoclima S 600 Pharma), apresentava já bolores superficiais e internos e outras injúrias induzidas pela longa exposição à baixa temperatura, inviabilizando assim a realização dos ensaios.

## 3 Materiais e Métodos

### 3.1 Locais de Estudo

O estudo foi realizado em Montados de sobreiro, de azinheira e mistos aleatoriamente distribuídos na região do Alentejo, cobrindo grande parte da região por forma a incluir variabilidade nas características climáticas (Figura 3.1). Foram contabilizados 67 locais de amostragem distribuídos num gradiente espacial de aridez: 42 para *Q. rotundifolia* (QR) e 25 para *Q. suber* (QS). Os valores do índice de aridez (IA) variaram entre 0.423 [mais árido] a 0.801 [mais húmido] (dados do período 1970–2000 obtidos na CGIAR-CSI global aridity database, <http://www.cgiar-csi.org/data/global-aridity-and-pet-database>; Trabuço *et al.*, 2019). Nos locais de amostragem QR, o índice de aridez variou entre 0.423 e 0.602, enquanto nos locais QS variou entre 0.431 e 0.801. Esta distribuição determina duas classes climáticas para QR, semi-árido ( $0.2 < IA < 0.5$ ) e seco sub-húmido ( $0.5 < IA < 0.65$ ), e três classes climáticas para QS, semi-árido, seco sub-húmido e húmido ( $IA > 0.65$ ).



**Figura 3.1.** Distribuição no gradiente de aridez dos locais de amostragem QR e QS na região do Alentejo (Mapa gerado em QGIS 3.14).

### 3.2 Material Biológico

Durante o período compreendido entre outubro e dezembro de 2018 e em cada local de amostragem, 10 árvores adultas foram selecionadas para proceder à recolha de bolota. De cada árvore, foram aleatoriamente colhidas 10 bolotas distribuídas em diferentes ramos na copa. Das bolotas colhidas foram tomadas as medições morfológicas conforme descrito abaixo. No laboratório, as bolotas inteiras (com casca) foram secas em estufa (Memmert) a 60 °C durante 48 h, segundo Alegria *et al.* (2018a), onde foi verificado que estas condições de secagem promovem a fracturabilidade da casca (1.8 mm – medida que representa a “distância de compressão até rutura” da amostra, neste caso da casca de bolota), favorecendo o descasque enquanto garante uma desidratação adequada (conteúdo em água  $< 0.1 \text{ g}_{\text{H}_2\text{O}}/\text{g}_{\text{sólidos}}$ ) e a prevenção de reações de escurecimento induzidas pelo descasque em fresco. Após

secagem e descasque (incluindo remoção da testa), foram constituídas amostras compostas por ponto de amostragem (mistura das bolotas das 10 árvores; n=67), sendo as polpas moídas numa primeira fase em moinho de café e, numa segunda fase, em moinho de esferas (Retsch MM2000). Estas amostras foram cedidas pelos projetos "Adding value to Montado acorn production: Innovation and tradition for a sustainable growth" (SFRH/BPD/126703/2016) e "REALMed - Pursuing authenticity and valorization of Mediterranean traditional products" (ARIMNet2, 2014–2017; ERA-NET grant agreement No. 618127; FCT ARIMNET2/0005/2016).

### 3.3 Variáveis Bioclimáticas, Índice de Aridez e Potencial de Evapotranspiração

Os dados das variáveis bioclimáticas (19 variáveis, Tabela 3.1), evapotranspiração (PET) e índice de aridez (IA) foram extraídos das plataformas World Clim (dados de 1970 a 2000; <https://www.worldclim.org/>) e da base de dados de aridez global CGIAR-CSI (dados de 1970 a 2000; <http://www.cgiar-csi.org/data/global-aridity-and-pet-database>) e intersetados com as coordenadas geográficas dos locais de amostragem (ArcGIS® v10.5.1). O conjunto de dados foi cedido pelos projetos "Adding value to Montado acorn production: Innovation and tradition for a sustainable growth" (SFRH/BPD/126703/2016) e "REALMed - Pursuing authenticity and valorization of Mediterranean traditional products" (ARIMNet2, 2014–2017; ERA-NET grant agreement No. 618127; FCT ARIMNET2/0005/2016).

**Tabela 3.1.** Descrição das variáveis bioclimáticas, abreviação e cálculo (dados retirados de <https://www.worldclim.org/>).

Descrição da variável bioclimática	Abreviação	Cálculo/Tipo de informação
Temperatura média anual	Bio01	Clima global, 1970-2000, média mensal
Varição de temperatura diurna	Bio02	Média Mensal (temp max – temp min)
Isotermalidade	Bio03	$(\text{AmpTer\_diurno}/\text{TempAn\_var}) * 100$
Temperatura sazonal	Bio04	$(\text{Desvio Padrão TempMed\_An} * 100)$
Temperatura máxima do mês mais quente	Bio05	Clima global, 1970-2000, média mensal
Temperatura mínima do mês mais frio	Bio06	Clima global, 1970-2000, média mensal
Amplitude da temperatura anual	Bio07	$\text{TempMax\_MesQuen} - \text{TempMin\_MesFrio}$
Temperatura média do quarto mais húmido	Bio08	Clima global, 1970-2000, média mensal
Temperatura média do quadrimestre mais seco	Bio09	Clima global, 1970-2000, média mensal
Temperatura média do quadrimestre mais quente	Bio10	Clima global, 1970-2000, média mensal
Temperatura média do quadrimestre mais frio	Bio11	Clima global, 1970-2000, média mensal
Precipitação média anual	Bio12	Clima global, 1970-2000, média mensal
Precipitação do mês mais húmido	Bio13	Clima global, 1970-2000, média mensal
Precipitação do mês mais seco	Bio14	Clima global, 1970-2000, média mensal
Precipitação sazonal	Bio15	Coefficiente de Variação
Precipitação do quadrimestre mais húmido	Bio16	Clima global, 1970-2000, média mensal
Precipitação do quadrimestre mais seco	Bio17	Clima global, 1970-2000, média mensal
Precipitação do quadrimestre mais quente	Bio18	Clima global, 1970-2000, média mensal
Precipitação do quadrimestre mais frio	Bio19	Clima global, 1970-2000, média mensal



Na Tabela 3.2, apresenta-se o resumo dos gradientes bioclimáticos e ambientais verificados nos locais de amostragem de bolota de *Q. rotundifolia* e *Q. suber*.

**Tabela 3.2.** Sumário estatístico das 19 variáveis bioclimáticas, índice de aridez (IA) e potencial de evapotranspiração (PET) dos locais de amostragem de ambas as espécies, *Q. rotundifolia* e *Q. suber*.

Descodificação das variáveis bioclimáticas conforme apresentado na Tabela 3.1. SE – Erro padrão; DP – Desvio padrão.

Variável	<i>Q. rotundifolia</i>					<i>Q. suber</i>				
	Min	Max	Média	SE	DP	Min	Max	Média	SE	DP
<b>Bio1</b>	15.66	17.11	16.32	0.05	0.34	14.62	17.11	16.19	0.09	0.47
<b>Bio2</b>	9.63	12.23	11.43	0.09	0.55	9.10	12.07	10.89	0.15	0.77
<b>Bio3</b>	42.11	46.31	44.31	0.17	1.11	38.08	45.95	44.15	0.33	1.63
<b>Bio4</b>	467.18	591.61	530.30	4.10	26.55	457.84	569.08	511.26	5.13	25.66
<b>Bio5</b>	27.00	30.00	28.53	0.11	0.74	26.00	29.70	27.84	0.15	0.77
<b>Bio6</b>	1.50	4.70	2.74	0.10	0.68	1.90	5.20	3.18	0.17	0.86
<b>Bio7</b>	22.30	28.00	25.79	0.18	1.15	21.90	27.50	24.66	0.26	1.28
<b>Bio8</b>	10.28	11.88	11.11	0.07	0.44	9.20	12.00	11.14	0.12	0.61
<b>Bio9</b>	22.07	24.08	22.95	0.08	0.51	21.50	23.83	22.52	0.10	0.48
<b>Bio10</b>	22.37	24.20	23.20	0.07	0.48	21.93	24.00	22.83	0.09	0.44
<b>Bio11</b>	9.45	10.95	10.25	0.06	0.41	8.43	11.17	10.31	0.12	0.59
<b>Bio12</b>	534.00	666.00	591.00	7.01	45.43	542.00	759.00	639.40	11.39	56.96
<b>Bio13</b>	80.00	108.00	95.45	1.04	6.75	85.00	115.00	101.68	1.28	6.40
<b>Bio14</b>	2.00	5.00	3.83	0.12	0.76	3.00	7.00	4.28	0.19	0.94
<b>Bio15</b>	53.71	66.72	60.44	0.48	3.11	56.35	66.72	60.66	0.51	2.56
<b>Bio16</b>	224.00	289.00	255.93	2.90	18.78	234.00	324.00	277.40	4.50	22.50
<b>Bio17</b>	22.00	37.00	28.76	0.59	3.85	22.00	45.00	30.60	0.96	4.82
<b>Bio18</b>	27.00	44.00	34.60	0.72	4.65	27.00	50.00	37.28	1.05	5.24
<b>Bio19</b>	210.00	275.00	241.19	3.03	19.66	219.00	306.00	263.12	4.54	22.69
<b>PET</b>	1119.00	1242.00	1186.48	6.17	39.99	1071.00	1232.00	1147.68	8.25	41.24
<b>IA</b>	0.423	0.602	0.498	0.009	0.060	0.431	0.801	0.561	0.017	0.084

## 3.4 Métodos Analíticos

### 3.4.1 Análise Morfológica

As bolotas (n=100 [10 por árvore; 10 árvores]) foram pesadas (Startorius BP2215) e o comprimento (mm) e diâmetro (mm) medidos com recurso a uma craveira digital (0.05 mm de resolução). O volume das bolotas (cm<sup>3</sup>) foi determinado por aproximação ao volume esferoide prolato, de acordo com a equação 3.1, em que *a* representa o raio menor (diâmetro/2) e *b* o raio maior (comprimento/2).

$$V = \frac{4}{3} \times \pi \times a^2 \times b \quad \text{equação 3.1}$$

Os dados morfológicos da bolota de ambas as espécies foram cedidos pelos projetos "Adding value to Montado acorn production: Innovation and tradition for a sustainable growth" (SFRH/BPD/126703/2016) e "REALMed - Pursuing authenticity and valorization of Mediterranean traditional products" (ARIMNet2, 2014–2017; ERA-NET grant agreement No. 618127; FCT ARIMNET2/0005/2016).

### 3.4.2 Determinação do Conteúdo em Açúcares Solúveis e Amido

A determinação do conteúdo em açúcares da bolota baseia-se num método enzimático, permitindo a quantificação dos açúcares solúveis sacarose, glucose e frutose, e a quantificação dos açúcares insolúveis, ie., amido. A partir das quantificações dos açúcares solúveis e insolúveis, foi calculado o teor em açúcares total e os contributos (%) das diferentes frações.

#### 3.4.2.1 Extração

Uma alíquota de 0,1 g (Startorius BP2215) das amostras compostas de bolota (triplicados), foi homogeneizada (vórtex; Scientific Industries Vortex-Genie 2) com 1,5 ml de etanol (80%). Após homogeneização, as misturas foram colocadas em banho seco (80 °C, 5 min) e centrifugadas (16 000 g x 5 min; Eppendorf Centrifuge 5415 C), reservando-se o sobrenadante. A extração foi repetida duas vezes, com ressuspensão do *pellet* em etanol (80%, 1,5 ml) e recolha dos sobrenadantes. O *pool* de sobrenadantes e o *pellet* final foram secos (60 °C, *overnight*), e os resíduos secos dos sobrenadantes utilizados de imediato para a quantificação de açúcares solúveis, sendo os *pellets* secos reservados (-20 °C) para posterior quantificação do amido.

#### 3.4.2.2 Quantificação dos Açúcares Solúveis

A fração de açúcares solúveis, sacarose, glucose e frutose, foram determinados com recurso ao kit *Sucrose/D-Fructose/D-Glucose, UV method* (ref. AK00201, Nzytech) após ressuspensão dos resíduos secos dos sobrenadantes em água. Para acerto da concentração em açúcares ao limite de deteção do kit utilizado (4-80 µg de D-fructose, D-glucose ou sacarose por ml de amostra), procedeu-se à medição do teor em sólidos solúveis num refratómetro digital (ATAGO PAL-1). De acordo com os valores de grau de *brix* obtidos, as amostras de QR foram ressuspensas num volume de 3 ml e as QS em 2 ml de água, procedendo-se posteriormente à quantificação dos açúcares solúveis conforme descrito no protocolo do kit com a adaptação dos volumes das soluções tampão e enzimáticas para um décimo do descrito, situação validada por Abreu *et al.* (2019). As leituras de absorvância (340 nm) foram realizadas num leitor de microplacas BioTek Epoch 2, com correção da absorvância para l = 1 cm, e os resultados foram expressos em mg/g.

#### 3.4.2.3 Quantificação do Amido

A fração amido (açúcar insolúvel) foi igualmente quantificada com recurso ao *Sucrose/D-Fructose/D-Glucose, UV method* (ref. AK00201, Nzytech) apenas para a deteção de D-Glucose, após hidrólise ácida a quente. Os *pellets* secos foram ressuspensos em 250 µl de HCl 30% e a hidrólise

promovida pelo calor (banho seco; 90 °C, 10 min). Seguiu-se a neutralização dos extratos (KOH 5 N) e centrifugação dos mesmos a 16 000 g x 10 min (Eppendorf Centrifuge 5415 C). A quantificação do amido, em equivalentes de glucose, realizou-se conforme descrito no protocolo do kit com a referida adaptação, e os resultados expressos em mg de equivalentes de glucose por g de peso seco de amostra (mg EG/g).

### **3.4.3 Determinação do Conteúdo Fenólico Total e Taninos**

Os dados das determinações do conteúdo fenólico total e conteúdo em taninos da bolota de ambas as espécies foram cedidos pelo projeto "Adding value to Montado acorn production: Innovation and tradition for a sustainable growth" (SFRH/BPD/126703/2016).

A determinação do conteúdo fenólico total (CFT) e do conteúdo em taninos (CT) foi adaptada dos métodos descritos por Rakić *et al.* (2007) e Swain e Hillis (1959).

#### **3.4.3.1 Extração**

Brevemente, as amostras compostas secas (triplicados) foram extraídas em metanol (1:10, p:v) por 24 h à temperatura ambiente e as misturas centrifugadas (10 000 g x 10 min; Eppendorf 5427 R), reservando-se os extratos polifenólicos (sobrenadantes). A quantificação dos conteúdos fenólico total e taninos é baseada na reação colorimétrica promovida pelo reagente *Folin-Ciocalteu*.

#### **3.4.3.2 Determinação do Conteúdo Fenólico Total**

Para o doseamento dos fenólicos totais (CFT), uma alíquota (150 µl) do extrato polifenólico diluído 25x é misturada com 2400 µl de água nanopura adicionando-se em seguida 150 µl de reagente *Folin-Ciocalteu* (0,25 N). Após 3 min de reação, adiciona-se 300 µl de 1 N carbonato de sódio, deixando-se reagir durante 2 h em condições de obscuridade à temperatura ambiente, período após o qual se realizaram as leituras espectrofotométricas a  $\lambda=725$  nm (espectrofotómetro ATI UNICAM UV/VIS 4). Os cálculos baseiam-se na interpolação dos valores de absorvância na curva de calibração de ácido gálico, expressando-se os resultados em mg de equivalentes de ácido gálico por g de bolota (mg EAG/g).

#### **3.4.3.3 Determinação do Conteúdo em Taninos**

O conteúdo em taninos (CT) foi determinado com recurso a polivinilpolipirrolidona insolúvel (PVPP), que adsorve e precipita os taninos presentes no extrato polifenólico obtido. A 1 ml do extrato polifenólico foi adicionado 0.1 g de PVPP, a mistura vortexada, e permitida a reação por 15 min. As misturas foram centrifugadas (10 000 g x 10 min; Eppendorf 5427 R) e o sobrenadante, fração não tanina, doseado conforme descrito para os fenólicos totais. O conteúdo em taninos foi calculado pela diferença entre o conteúdo fenólico total e o conteúdo fenólico não tanino, expressando-se os resultados em mg EAG/g.

### **3.4.4 Determinação do Teor em Proteína**

O teor de proteína foi obtido pela multiplicação do conteúdo em azoto (cf. 3.4.5 Composição Isotópica e Análise Elementar) pelo fator de conversão (6.25).

### 3.4.5 Composição Isotópica e Análise Elementar

A determinação da composição isotópica e elementar das amostras compostas de bolota ( $n_{\text{total}}=67$ ;  $n_{\text{QR}}=42$  e  $n_{\text{QS}}=25$ ) foi realizada no Laboratório de Isótopos Estáveis (LIE-SIIAF), Centro de Ecologia, Evolução e Mudanças Ambientais, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa. Uma alíquota (5 µg; Sartorius XM 1000 P) das amostras compostas foram encapsuladas em cápsulas de estanho (5x9 mm; E12007 Euro Vector, Itália) e as razões  $\delta^{13}\text{C}$ ,  $\delta^{15}\text{N}$  e as concentrações de carbono (C, %) e azoto (N, %) determinados por espectrometria de massa de razões isotópicas de fluxo contínuo (CF-IRMS) com recurso a um espectrómetro de massa de razões isotópicas Sercon Hydra 20-22 (Sercon, UK) acoplado a um analisador elementar EuroEA (Euro Vector, Itália).

As razões isotópicas foram expressas em ‰ usando as referências Vienna-Pee Dee Belemnite para o  $\delta^{13}\text{C}$  e ar para  $\delta^{15}\text{N}$  de acordo com a equação 3.2, em que  $R$  representa a razão entre o isótopo pesado e o leve.

$$\delta\text{‰} = \frac{(R_{\text{amostra}} - R_{\text{referência}})}{R_{\text{referência}}} \times 1000 \quad \text{equação 3.2}$$

Os valores foram calculados considerando padrões internos calibrados contra materiais de referência internacionais: USGS25 e USGS35 (IAEA-International Atomic Energy Agency, Viena, Áustria;  $\delta^{15}\text{N} = -30,4 \pm 0,4\text{‰}$  VAIR e  $\delta^{15}\text{N} = +2,7 \pm 0,2\text{‰}$  VAIR, respectivamente) para  $\delta^{15}\text{N}$  e IAEA-CH-7 (IAEA- International Atomic Energy Agency, Viena, Áustria;  $\delta^{13}\text{C} = -32,151 \pm 0,05\text{‰}$  vPDB) e glucose BCR-657 (Community Bureau of Reference of the European Commission;  $\delta^{13}\text{C} = -10,76 \pm 0,04\text{‰}$  vPDB) para  $\delta^{13}\text{C}$ . O grau de incerteza por ciclo de análise foi  $\leq 0,1\text{‰}$ , considerando 6–9 replicados do material de referência isotópico secundário intercalado entre as amostras. Os dados isotópicos e elementares da bolota de ambas as espécies foram cedidos pelos projetos "Adding value to Montado acorn production: Innovation and tradition for a sustainable growth" (SFRH/BPD/126703/2016) e "REALMed - Pursuing authenticity and valorization of Mediterranean traditional products" (ARIMNet2, 2014–2017; ERA-NET grant agreement No. 618127; FCT ARIMNET2/0005/2016).

### 3.5 Tratamento Estatístico

No tratamento de resultados, para cada uma das respostas avaliadas, foi realizada estatística descritiva, através da determinação da média, desvio padrão, e erro por amostra.

Para compreender o efeito espécie foi realizado o teste não paramétrico Kruskal-Wallis, com um nível de significância  $\alpha=0,05$ , seguido do teste Dunn para separação de médias, uma vez que a normalidade não foi encontrada. Acresceu a determinação das correlações não-paramétricas entre as variações das respostas avaliadas por espécie (correlação de Spearman). O efeito "espécie x classe de aridez" foi determinado seguindo a mesma abordagem, excluindo a classe de aridez "húmido", já que tal condição apenas foi encontrada para QS em dois pontos de amostragem ( $n_{\text{QR semi-árido}}=23$ ,  $n_{\text{QR Seco sub-húmido}}=19$  [ $n_{\text{total}}=42$ ],  $N_{\text{QS semi-árido}}=6$ ,  $n_{\text{QS Seco sub-húmido}}=17$  [ $n_{\text{total}}=23$ ]). Estas análises estatísticas foram realizadas com recurso ao software Rstudio v1.3.1093 (PBC, Boston, Massachusetts, EUA).

Foi realizada uma análise multivariada (componentes principais, PCA) para estabelecer relações entre espécie, classes de aridez e parâmetros morfológicos, químicos e isotópicos de bolota. A análise de componentes principais foi realizada com recurso ao software StatisticaTM v.8 (StatSoft Inc., 2007). Todas as variáveis foram centradas na média e normalizadas para variância unitária previamente à

análise (matriz de correlação). Os componentes principais foram obtidos por determinação dos *eigenvalues* e *eigenvectors* da matriz de correlação dos dados (Jackson, 1991). Para cada componente da PCA, os *scores* das amostras foram calculados como combinação linear de cada variável e a contribuição de cada variável para os *scores* da PCA deduzidos a partir das correlações fator-variável (*loading factors*). A representação bidimensional do conjunto multidimensional foi igualmente realizada recorrendo ao software StatisticaTM v.8 (StatSoft Inc., 2007).

A multicolinearidade entre as potenciais variáveis bioclimáticas e ambientais explicativas para cada espécie (preditores) foi tratada pela eliminação das variáveis colineares quando correlacionadas (correlação de Spearman) com  $|\rho| > 0,7$  ( $p > 0,05$ ) (Dormann *et al.*, 2013). Esta seleção resultou num conjunto reduzido de seis potenciais variáveis explicativas para QR (índice de aridez [IA], temperatura média anual [Bio1], isothermalidade [Bio3], amplitude da temperatura anual [Bio7], precipitação no mês mais húmido [Bio13] e precipitação no mês mais seco [Bio14]) e de cinco potenciais variáveis explicativas para QS (temperatura média anual [Bio1], isothermalidade [Bio3], temperatura mínima do mês mais frio [Bio6], precipitação média anual [Bio12] e precipitação sazonal [Bio15]). A verificação do efeito das variáveis bioclimáticas e ambientais selecionadas sobre as respostas avaliadas nos dois tipos de amostras (amostras de bolota de *Q. rotundifolia* e de *Q. suber*), foi realizada com recurso ao teste não paramétrico Kruskal-Wallis (separação de médias pelo teste Dunn,  $\alpha = 0,05$ ).

A análise de regressão linear múltipla é uma ferramenta estatística para determinar a relação entre uma única variável dependente e um conjunto de variáveis independentes para melhor representar uma relação em uma população (Field, 2009). Esta análise é uma forma de prever uma variável de resposta a partir de uma variável preditora, apresentando potencial preditivo ou explicativo de diferentes tipologias de desenhos experimentais. A equação do modelo é dada pela equação 3.3, onde  $Y$  representa a variável dependente,  $X_1$  a  $X_m$  o conjunto das múltiplas variáveis independentes,  $B_0$  a  $B_m$  o coeficiente de regressão e  $e$  o erro aleatório.

$$Y = B_0 + B_1X_1 + B_2X_2 + \dots + B_mX_m + e \quad \text{equação 3.3}$$

Neste trabalho, o modelo de regressão linear múltipla foi utilizado para explorar a influência de diferentes variáveis ambientais sobre as respostas morfológicas, químicas e ecofisiológicas de bolotas de *Q. rotundifolia* e *Q. suber*, utilizando para o efeito o software StatisticaTM v.8 (StatSoft Inc., 2007). As respostas acima mencionadas foram tidas como variáveis dependentes, enquanto as diferentes variáveis ambientais consideradas como preditores, após verificação de multicolinearidade conforme descrito. Para eliminação de preditores e seleção do modelo, foram aplicados os procedimentos de regressão “passo à frente” (*forward stepwise*), onde se considera como passo inicial apenas uma constante, procurando-se o preditor que melhor “prevê” a resposta (maior coeficiente de correlação) e aumenta significativamente o ajuste do modelo. Caso estas condições sejam verificadas, o preditor é mantido, procurando-se um segundo preditor e a respetiva capacidade de melhorar de forma significativa o ajuste do modelo e assim sucessivamente.

## 4 Resultados e Discussão

### 4.1 Características Morfológicas, Químicas e Isotópicas da Bolota em Função da Espécie

Neste capítulo são avaliadas as diferenças entre diferentes parâmetros de qualidade físico-química e ecofisiológica das bolotas de *Quercus rotundifolia* Lam. (QR) e de *Quercus suber* L. (QS), objetivando a caracterização das espécies e respetiva variabilidade no contexto espacial avaliado (Montado Alentejano) assim como a verificação do potencial da bolota como fonte alimentar alternativa e respetiva aptidão tecnológica.

Na caracterização das espécies foram avaliadas as respostas morfológicas, químicas e a composição isotópica e elemental das bolotas de ambas as espécies, independentemente da origem geográfica das amostras ( $n_{QR}=42$ ;  $n_{QS}=25$ ). O efeito espécie foi explorado a partir da comparação das respostas mencionadas com recurso a testes não paramétricos (Kruskal–Wallis *one-way analysis of variance*) e a verificação de respostas integradoras alcançada pela avaliação das correlações entre os parâmetros avaliados (Spearman's rho).

#### 4.1.1 Respostas Morfológicas

As características morfológicas das sementes contribuem para a compreensão das respostas da planta às condições ambientais, desempenho e capacidade de estabelecimento. Por exemplo, o tamanho da semente correlaciona-se com a capacidade de recrutamento e adaptação da planta às condições ambientais em que se insere (Hernández *et al.*, 2010; Volis e Bohrer, 2013), onde sementes maiores aprovisionam uma nutrição adequada ao desenvolvimento de plântulas maiores (Metz *et al.*, 2010). Já no contexto alimentar, as características morfológicas são importantes para, por exemplo, determinar a aceitabilidade do produto (calibres) e estimar rendimentos na transformação tecnológica.

A nível da morfologia (Tabela 4.1), a espécie apresentou um efeito significativo para todas as respostas avaliadas, com exceção do diâmetro ( $\sim 16.6 \text{ cm}^3$  para ambas as espécies,  $p>0.05$ ). Assim, foram verificadas diferenças significativas entre o comprimento, o volume e o peso das amostras de bolotas de QR e QS, onde as bolotas QR (38.59 mm,  $5.70 \text{ cm}^3$ , 8.11 g, respetivamente) registaram valores significativamente superiores às de QS (32.21 mm,  $4.94 \text{ cm}^3$ , 7.21 g, respetivamente).

**Tabela 4.1.** Parâmetros morfológicos das amostras de bolota das espécies *Quercus rotundifolia* e *Quercus suber*.

Espécie	Comprimento (mm)	Diâmetro (mm)	Volume ( $\text{cm}^3$ )	Peso (g)
<i>Quercus rotundifolia</i>	$38.59^b \pm 2.62$	$16.57^{ns} \pm 2.28$	$5.70^b \pm 3.94$	$8.11^b \pm 0.15$
<i>Quercus suber</i>	$32.21^a \pm 3.36$	$16.59^{ns} \pm 2.30$	$4.94^a \pm 4.06$	$7.21^a \pm 0.24$

Na mesma coluna, valores médios com letras diferentes apresentam diferenças significativas a  $p<0.05$  (post-hoc Kruskal-Wallis). ns – não significativo.

No estudo de Alegria *et al.* (2020) são reportadas diferenças não significativas para os mesmos parâmetros morfológicos da bolota de *Q. rotundifolia* e *Q. suber*, apresentando intervalos de variação para o comprimento (33.39 e 43.50 mm para QR e 25.33 e 44.51 mm para QS), diâmetro (11.76 e 16.85 mm para QR e 11.93 e 18.96 mm para QS), volume (2.58 e  $6.03 \text{ cm}^3$  para QR e 25.33 e  $44.51 \text{ cm}^3$  para QS) e peso (3.91 e 7.48 g para QR e 3.29 e 10.18 g para QS) das bolotas. Independentemente do significado das diferenças encontradas nas características morfológicas das bolotas, os valores

determinados neste estudo encontram-se de acordo com os intervalos reportados em Alegria *et al.* (2020). Estévez *et al.* (2007) determinaram valores de comprimento entre 30-40 mm e de diâmetro entre 12-17 mm em bolotas de *Q. rotundifolia*, suportando os valores determinados no presente estudo, enquanto Fernández *et al.* (2004 cit in Estévez *et al.*, 2007) determinaram pesos inferiores aos registados, de 5.2 g e de 6.6 g para *Q. ilex* e *Q. suber*, respetivamente.

Independentemente da espécie, o volume explica de forma significativa as variações do comprimento ( $\rho_{QR}=0.57$ ;  $\rho_{QS}=0.75$ ), diâmetro ( $\rho_{QR}=0.95$ ;  $\rho_{QS}=0.94$ ) e peso ( $\rho_{QR}=0.90$ ;  $\rho_{QS}=0.94$ ) das amostras de bolota de QR e de QS, conforme se apresenta na Tabela 4.2. A aferição de que o volume representa uma resposta integradora dos parâmetros morfológicos da bolota de QS foi também verificado por Alegria *et al.* (2020), enquanto que, nesse estudo e para QR o volume não apresentou uma correlação significativa com o peso das bolotas.

**Tabela 4.2.** Matriz de correlações de Spearman entre as respostas morfológicas avaliadas em bolotas de *Q. rotundifolia* (QR; identificado a amarelo) e de *Q. suber* (QS; identificado a verde).

	Comprimento	Diâmetro	Volume	Peso	
<b>Comprimento</b>	1.00	0.31	<b>0.57***</b>	<b>0.50**</b>	<b>QR</b>
<b>Diâmetro</b>	<b>0.59**</b>	1.00	<b>0.92***</b>	<b>0.80***</b>	
<b>Volume</b>	<b>0.75***</b>	<b>0.94***</b>	1.00	<b>0.90***</b>	
<b>Peso</b>	<b>0.69***</b>	<b>0.89***</b>	<b>0.94***</b>	1.00	

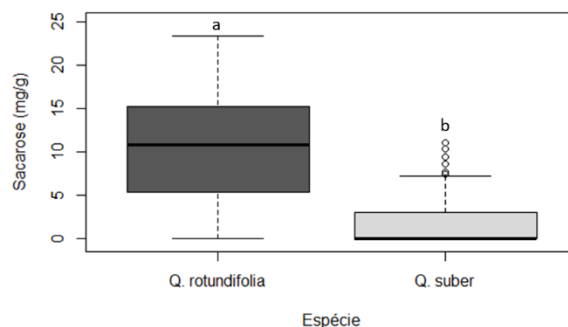
Correlações significativas são destacadas a negrito. \*  $p<0.05$ ; \*\*  $p<0.01$ ; \*\*\*  $p<0.001$ . n=42 para QR e n=25 para QS.

## 4.1.2 Respostas Químicas

### 4.1.2.1 Açúcares

Os hidratos de carbono são os nutrientes mais abundantes das bolotas do género *Quercus*, com destaque para o amido. No presente estudo, foram avaliados os conteúdos em açúcares solúveis como sacarose, glucose e frutose, e insolúveis como amido, de amostras de bolota de *Q. rotundifolia* (QR) e *Q. suber* (QS), apresentando-se em seguida os resultados obtidos.

Na Figura 4.1 são apresentadas as variações nos teores em sacarose determinados nas amostras de bolota de ambas as espécies. Os teores médios em sacarose determinados nas amostras de bolota QR ( $10.23\pm6.31$  mg/g) foram significativamente superiores aos das amostras de bolota QS ( $1.32\pm2.5$  mg/g), verificando-se que os teores em sacarose das bolotas são significativamente influenciados pelo efeito espécie ( $p<0.001$ ).



**Figura 4.1.** Box-plots dos teores em sacarose de bolota de *Q. rotundifolia* e *Q. suber*. Diferenças significativas entre as amostras de bolota são indicadas com letras diferentes (post-hoc Kruskal-Wallis,  $\alpha=0.05$ ).

Na Tabela 4.3 são apresentados os valores médios dos teores em glucose e em frutose das amostras de bolota QR e QS. Desta, é possível verificar que, contrariamente ao observado para a sacarose, foram determinadas concentrações de glucose superiores ( $p<0.01$ ) nas amostras de bolota QS (9.02 mg/g) face às de QR (7.57 mg/g). Esta mesma relação é evidenciada por Correia (2010), que verificou em bolotas de sobreiro (QS) teores em glucose superiores aos das bolotas de azinheira (QR). Embora os valores reportados por Correia (2010) sejam da mesma ordem de grandeza para as bolotas QR, os quantitativos em glucose para as bolotas QS apresentaram concentrações de dobro face às determinadas no presente estudo. As diferenças entre os quantitativos de glucose de bolota QS podem ser explicadas pelas distintas condições ambientais entre os estudos, uma vez que os locais de amostragem são geograficamente distintos: região da Beira, com características ambientais mais húmidas, em comparação com a região do Alentejo, com características entre o seco sub-húmido e semi-árido.

**Tabela 4.3.** Conteúdo em glucose e frutose das amostras de bolota das espécies *Quercus rotundifolia* e *Quercus suber*.

Espécie	Glucose (mg/g)	Frutose (mg/g)
<i>Quercus rotundifolia</i>	7.57 <sup>b</sup> ± 2.62	11.07 <sup>ns</sup> ± 3.94
<i>Quercus suber</i>	9.02 <sup>a</sup> ± 3.36	11.14 <sup>ns</sup> ± 4.06

Na mesma coluna, valores médios com letras diferentes apresentam diferenças significativas a  $p<0.05$  (post-hoc Kruskal-Wallis).

Em relação aos teores em frutose (Tabela 4.3), superiores aos de glucose, não foram encontradas diferenças com significado estatístico ( $p>0.05$ ) entre as amostras de bolota de ambas as espécies (11.07 vs. 11.14 mg/g para QR e QS, respetivamente). Reportando ao estudo de Correia (2010), os quantitativos em frutose de bolotas QR foram superiores aos das bolotas QS (6.6 g/100 g vs. 4.3 g/100 g, respetivamente), constatando-se também que esses quantitativos foram quatro a seis vezes superiores aos determinados neste trabalho. À semelhança da glucose, as diferenças entre os quantitativos em frutose podem ser influenciadas pelas diferentes condições ambientais registadas nos respetivos locais de amostragem.

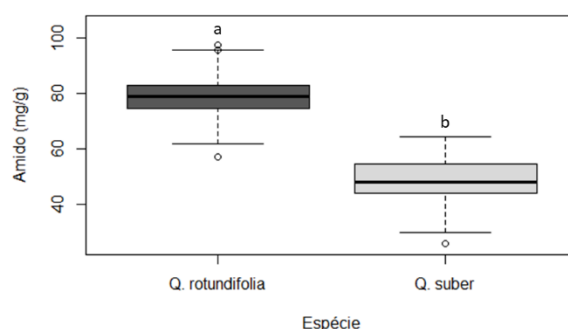
De facto, as condições ambientais têm uma grande influencia sobre os teores de sacarose, glucose e frutose nas bolotas QR e QS. Como já referido, o local de amostragem identificado por Correia (2010) refere-se a um ponto geográfico único (Idanha-a-Nova, na região da Beira Baixa) enquanto que a amostragem do presente estudo segue um gradiente de aridez da região do Alentejo com múltiplos pontos de amostragem (desde o Alto ao Baixo Alentejo, Litoral e Interior). As condições ambientais registadas na zona da Beira Baixa são classificadas como sendo uma região húmida, enquanto o gradiente avaliado neste trabalho inclui locais classificados como húmido, seco sub-húmido e semi-



árido. Sendo as amostragens realizadas em zonas com distintas disponibilidades em água, este poderá ser um fator a considerar na comparação dos teores em glucose e frutose das bolotas de ambas as espécies. Com efeito, Abreu *et al.* (2019) demonstraram que os teores em açúcares solúveis das bolotas de *Q. rotundifolia*, particularmente a frutose, diferem conforme as condições ambientais, verificando teores mais elevados em condições de maior aridez.

Destaca-se que o efeito espécie é significativo ( $p<0.001$ ) para a fração dos açúcares solúveis, correspondendo aos contributos (%) de sacarose, glucose e frutose, das amostras de bolota. No caso das amostras de bolota QS, o contributo da sacarose corresponde a ~7% do total dos açúcares solúveis, enquanto nas amostras de bolota QR o mesmo é de ~34%. Os contributos (%) de glucose e frutose para o total dos açúcares solúveis são igualmente distintos entre espécies ( $p<0.001$ ), mantendo as diferenças relativas entre as respostas. No entanto, salienta-se que as amostras de bolota QS verificam percentagens de glucose (~42%) e de frutose (~51%) significativamente superiores às registadas em QR (~27% e ~39% para glucose e frutose, respetivamente).

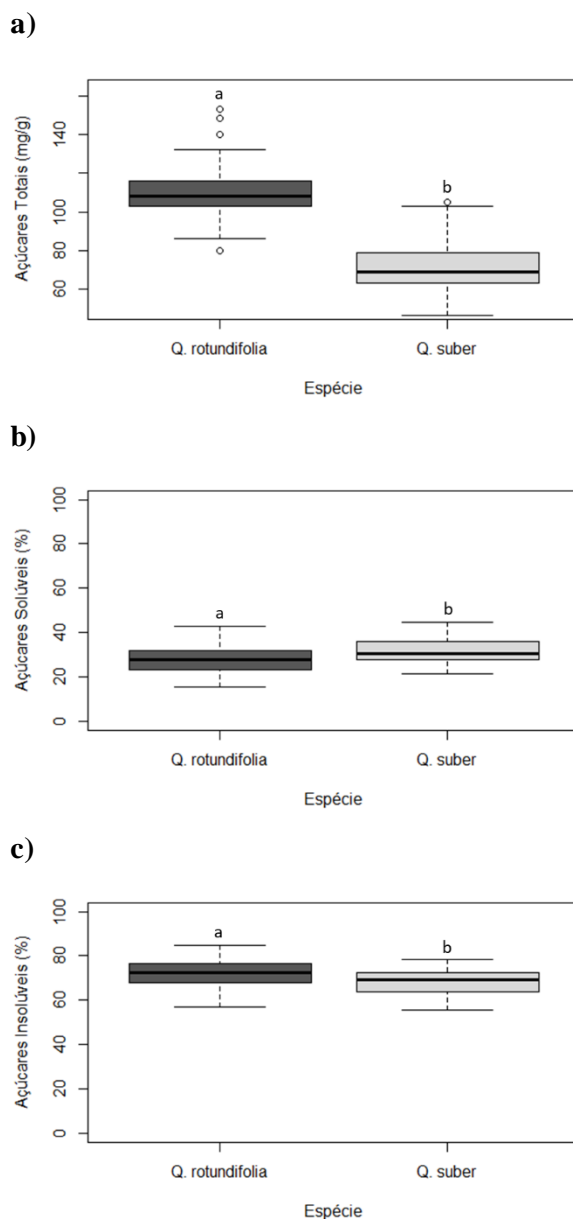
Em relação ao amido, cujos resultados são apresentados na Figura 4.2, foram determinados em amostra de bolota QR teores significativamente superiores ( $p<0.001$ ) aos de amostras de bolota QS, de  $78.34\pm5.45$  e  $48.72\pm5.05$  mg EG/g, respetivamente. Embora a comparação direta dos teores em amido determinados por Oliveira *et al.* (2012) para bolotas de *Q. rotundifolia* e *Q. suber* não seja possível pelas substanciais diferenças entre métodos de determinação, incluindo a expressão de unidades, os autores também concluíram que as bolotas de QR apresentam teores em amido significativamente superiores aos das bolotas QS.



**Figura 4.2.** Box-plots dos teores em amido de bolota de *Q. rotundifolia* e *Q. suber*. Diferenças significativas entre as amostras de bolota são indicadas com letras diferentes (post-hoc Kruskal-Wallis,  $\alpha=0.05$ ).

O efeito espécie implicou igualmente diferenças significativas ( $p<0.001$ ) no conteúdo em açúcares total (AT; açúcares solúveis + açúcares insolúveis), como se observa na Figura 4.3a. O teor em AT em amostras de bolota QR foi superior ( $p<0.05$ ) ao determinado nas amostras de bolota QS, de  $109.2\pm10.4$  mg/g e  $71.6\pm11.9$  mg/g, respetivamente. As relações entre açúcares solúveis e insolúveis (amido) das amostras de bolotas QR e QS são apresentadas na Figura 4.3b e Figura 4.3. Box-plots do conteúdo em Açúcares Total (a) e dos contributos percentuais de açúcares solúveis (b) e insolúveis (c) de bolota de *Q. rotundifolia* e *Q. suber*. Diferenças significativas entre as amostras de bolota são indicadas com letras diferentes (post-hoc Kruskal-Wallis,  $\alpha=0.05$ ), respetivamente, onde é possível observar que as amostras QS verificam uma maior contribuição da fração solúvel (sacarose+glucose+frutose) na contabilização dos açúcares totais, de 32%, enquanto que nas amostras QR, essa contribuição é significativamente inferior, de 28% (Figura 4.3b). Inversamente, a contribuição dos açúcares insolúveis (amido) é superior (72%,  $p<0.001$ ) nas amostras QR face às QS (68%) (Figura 4.3c). A prevalência da fração insolúvel, especificamente do amido, em bolotas de ambas as espécies

em relação aos outros açúcares solúveis é igualmente descrita em vários estudos (*e.g.*, Correia *et al.*, 2009; Orczykowska *et al.*, 2013; de Oliveira, 2014).



**Figura 4.3.** Box-plots do conteúdo em Açúcares Total (a) e dos contributos percentuais de açúcares solúveis (b) e insolúveis (c) de bolota de *Q. rotundifolia* e *Q. suber*. Diferenças significativas entre as amostras de bolota são indicadas com letras diferentes (post-hoc Kruskal-Wallis,  $\alpha=0.05$ )

Das correlações encontradas entre as diferentes respostas avaliadas em termos de açúcares nas amostras de bolota QR, os conteúdos em açúcares totais apresentam correlações significativas com todas as outras respostas. Em QS, este tipo de integração não é tão completo, em que os AT apenas se correlacionam de forma significativa com os teores de glucose, frutose, amido e, obviamente, com as frações em açúcares solúveis e insolúveis (Tabela 4.4).

**Tabela 4.4.** Matriz de correlações de Spearman entre as respostas relativas à componente de açúcares avaliadas em bolotas de *Q. rotundifolia* (QR; identificado a amarelo) e de *Q. suber* (QS; identificado a verde).

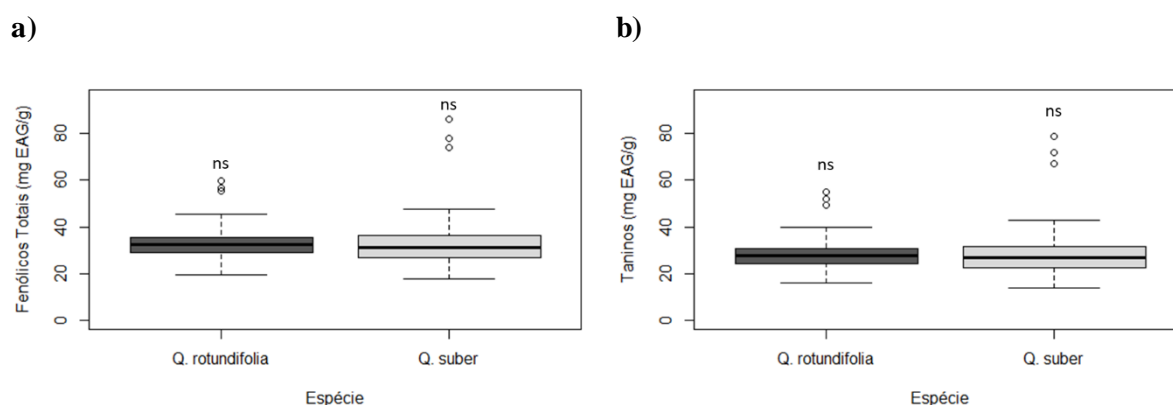
	Sac	Glu	Fru	Amido	AT	AS	AI	
<b>Sac</b>	1.00	-0.11	-0.14	-0.09	<b>0.46**</b>	<b>0.72***</b>	<b>-0.72***</b>	<b>QR</b>
<b>Glu</b>	-0.27	1.00	<b>0.79***</b>	0.14	<b>0.51***</b>	<b>0.54***</b>	<b>-0.54***</b>	
<b>Fru</b>	-0.13	<b>0.78***</b>	1.00	<b>0.33*</b>	<b>0.55***</b>	<b>0.48**</b>	<b>-0.48**</b>	
<b>Amido</b>	0.18	0.30	<b>0.45*</b>	1.00	<b>0.63***</b>	-0.11	0.11	
<b>AT</b>	0.17	<b>0.61**</b>	<b>0.74***</b>	<b>0.86***</b>	1.00	<b>0.64***</b>	<b>-0.64***</b>	
<b>AS</b>	0.05	<b>0.70***</b>	<b>0.74***</b>	-0.10	0.31	1.00	-1.00	
<b>AI</b>	-0.05	<b>-0.70***</b>	<b>-0.74***</b>	0.10	-0.31	-1.00	1.00	

Correlações significativas são destacadas a negrito. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ . Sac – sacarose (mg/g); Glu – Glucose (mg/g); Fru – frutose (mg/g); AT – açúcares totais (mg/g); AS – açúcares solúveis (%); AI – açúcares insolúveis (%).

#### 4.1.2.2 Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos são ubíquos no género *Quercus*, apesar da diversidade verificada entre espécies (Vinha *et al.*, 2016), as principais classes fenólicas (*e.g.*, ácidos fenólicos, flavonoides, taninos) são presentes nos *Quercus*, com destaque para os taninos.

Na Figura 4.4 apresenta-se o conteúdo fenólico total (CFT; Figura 4.4a) e o conteúdo em taninos (CT; Figura 4.4b). Na avaliação do CFT e do CT das amostras de bolota QR e QS, não foram registadas diferenças nestes conteúdos entre as amostras das duas espécies ( $p > 0.05$ ), com valores médios *ca* de 32.6 mg EAG/g e de 28.2 mg EAG/g, respetivamente. Por consequência, o conteúdo fenólico não tanino (CFNT) também não variou ( $p > 0.05$ ) entre as amostras das duas espécies, tomando valores de  $\approx 4.5$  mg EAG/g.



**Figura 4.4.** Box-plots do conteúdo fenólico total (CFT) (a) e do conteúdo em taninos (CT) (b) de bolota de *Q. rotundifolia* e *Q. suber*. ns – diferenças não significativas a  $p < 0.05$  (post-hoc Kruskal-Wallis).

A ausência de significado associado à espécie de bolota nestas repostas, particularmente sobre os taninos, difere à de outros estudos que verificam que as bolotas de *Q. suber* apresentam um teor em taninos superior às de *Q. rotundifolia* (Oliveira *et al.*, 2012; Vinha *et al.*, 2016; Passarinho *et al.*, 2019). Por exemplo, Oliveira *et al.* (2012) verificou diferenças significativas quer entre o conteúdo fenólico total quer entre o conteúdo em taninos extraíveis da bolota de *Q. rotundifolia* e *Q. suber*, onde *Q. suber* apresentou os teores mais elevados (75.2 vs. 39.7 g eq. ácido tânico/kg, para o CFT e 55.7 vs. 38.1 g eq. ácido tânico/kg). No entanto, uma vez mais, a diferença não significativa entre o CFT e CT determinados nas amostras de bolota QR e QS, pode encontrar justificação na amostragem realizada. Como referido anteriormente, a amostragem realizada abrange uma área territorial considerável que objetiva a

maximização da variabilidade das respostas (42 e 25 pontos de amostragem para QR e QS, respetivamente, 10 árvores amostradas por espécie por local). Já o estudo de Oliveira *et al.* (2012) focou apenas um ponto de amostragem (Herdade da Mitra, Évora; 4 árvores por espécie), com a verificação das mesmas condições ambientais para ambas as espécies. Num outro exemplo, como uma dimensão de amostra de 60 árvores na província de Vojvodina, Sérvia, Popović *et al.* (2013) também determinaram concentrações de fenólicos totais e de taninos semelhantes entre as espécies *Q. robur* e *Q. petraea* ( $\approx 16$  mgeq. de catequina/g e  $\approx 12$  mgeq. catequina/g, respetivamente). Assim, destaca-se uma vez mais a importância da origem geográfica, com condições ambientais características, e da dimensão da amostra na comparação dos parâmetros físico-químicos das espécies de *Quercus*.

Pelas correlações entre as respostas fenólicas avaliadas nas amostras de bolota QR e QS (Tabela 4.5), verifica-se que o conteúdo fenólico total (CFT) é uma resposta integradora das diferentes frações fenólicas determinadas nas amostras de bolota de ambas as espécies, apresentando correlações altamente significativas com o CFNT e CT, como expectável.

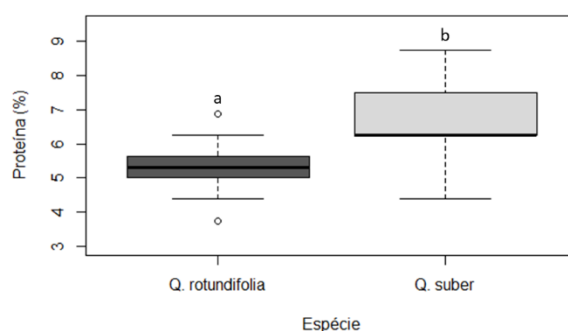
**Tabela 4.5.** Matriz de correlações de Spearman entre as respostas fenólicas avaliadas em bolotas de *Q. rotundifolia* (QR; identificado a amarelo) e de *Q. suber* (QS; identificado a verde).

	CFT	CFNT	CT	
CFT	1.00	<b>0.65***</b>	<b>1.00***</b>	QR
CFNT	<b>0.53**</b>	1.00	<b>0.60***</b>	
CT	<b>1.00***</b>	<b>0.50*</b>	1.00	

Correlações significativas são destacadas a negrito. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ . CFT – conteúdo fenólico total (mg EAG/g); CFNT - conteúdo fenólico não tanino (mg EAG/g); CT - conteúdo tanino (mg EAG/g).

#### 4.1.2.3 Teor Proteico

Os *Quercus* em geral, apresentam um baixo teor em proteína, a variar entre os 2% e 11% (Vinha *et al.*, 2016; Orczykowska *et al.*, 2013; Fernández *et al.*, 2005). Na Figura 4.5 é apresentado o teor proteico determinado nas amostras de bolota de *Q. rotundifolia* e *Q. suber*, onde se observa um teor superior ( $p < 0.001$ ) nas amostras de bolota QS (~7%) relativamente às amostras QR (~5%).



**Figura 4.5.** Box-plots do teor em proteína de bolota de *Q. rotundifolia* e *Q. suber*. Diferenças significativas entre as amostras de bolota são indicadas com letras diferentes (post-hoc Kruskal-Wallis,  $\alpha=0.05$ ).

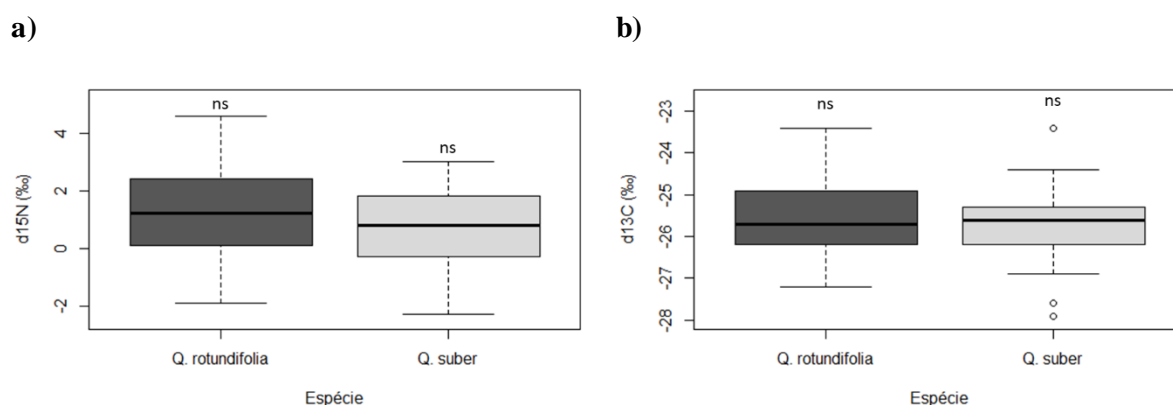
A diferença significativa entre o teor proteico das bolotas QR e QS é igualmente verificada por Cañellas *et al.* (2003) (5.1% e 7% para QR e QS, respetivamente), Passarinho *et al.* (2019) (2.26% e

4.08% para QR e QS, respetivamente) e Oliveira *et al.* (2012) (3.7% e 9.3% para QR e QS, respetivamente), enquanto Correia (2010) não verificou diferenças significativas entre os teores proteicos das bolotas destas espécies (4.8% e 4.2%, para QR e QS, respetivamente). Focando na bolota de *Q. rotundifolia*, de Oliveira (2014) avaliou intervalos de variação em proteína entre 4% a 7%, assim como Izquierdo *et al.* (2008) que refere um intervalo semelhante (4%-6%).

### 4.1.3 Respostas Isotópicas e Elementares

A composição isotópica de C e N das sementes está relacionada com os padrões de captação e alocação de carbono e azoto, eficiência de uso de água e azoto, uso de fontes de C e N e sinais de fontes locais (Hannachi *et al.*, 1996; Rodrigues *et al.*, 2013). Consequentemente, pode também refletir as condições ambientais e respostas específicas ao clima (por exemplo, quantidade de precipitação, aridez) (Alegria *et al.*, 2020).

Na Figura 4.6 são apresentadas as variações da composição isotópica em  $\delta^{15}\text{N}$  (Figura 4.6a) e  $\delta^{13}\text{C}$  (Figura 4.6b) das amostras de bolota de *Q. rotundifolia* e *Q. suber*. Nas composições isotópicas em  $\delta^{15}\text{N}$  e  $\delta^{13}\text{C}$ , verificam-se valores semelhantes entre as amostras de bolota das duas espécies ( $p>0.05$ ), com valores  $\delta^{15}\text{N}$  de  $1.5\text{‰}\pm 1.6\text{‰}$  e  $0.7\text{‰}\pm 1.4\text{‰}$ , e valores  $\delta^{13}\text{C}$  de  $-25.5\text{‰}\pm 0.8\text{‰}$  e  $-25.8\text{‰}\pm 1.1\text{‰}$  (Figura 4.6), para QR e QS, respetivamente. A diferença não significativa entre os rácios médios  $\delta^{15}\text{N}$  das duas espécies pode encontrar justificação na variabilidade de resultados encontrada, maior em QR face a QS (Figura 4.6a). De facto, o enriquecimento em  $^{15}\text{N}$  das bolotas QR face às de QS ( $p<0.05$ ) pode encontrar justificação na distribuição geográfica das espécies, onde QR é predominante em zonas mais áridas que QS, podendo desta forma ser influenciado pelas limitações em água e azoto do solo. A ausência do efeito espécie é também descrito por Alegria *et al.* (2020), onde foram determinados valores entre  $-1.1\text{‰}$  e  $6.9\text{‰}$  para  $\delta^{15}\text{N}$ , e entre  $-27.3\text{‰}$  e  $-20.0\text{‰}$  para  $\delta^{13}\text{C}$ . Em *Q. suber*, Martin *et al.* (2000) determinou um valor  $\delta^{13}\text{C}$  na ordem de  $-21.0\text{‰}$ , compatível com o intervalo anteriormente descrito. Em outras espécies de *Quercus*, Damesin *et al.* (1997) também verificou diferenças não significativas entre as assinaturas de  $\delta^{13}\text{C}$  das bolotas de *Quercus pubescens* e de *Quercus ilex*, com valores *ca* de  $-27\text{‰}$ .



**Figura 4.6.** Box-plots da composição isotópica  $\delta^{15}\text{N}$  (a; d15N) e  $\delta^{13}\text{C}$  (b; d13C) de bolota de *Q. rotundifolia* e *Q. suber*. Diferenças significativas entre as amostras de bolota são indicadas com letras diferentes (post-hoc Kruskal-Wallis,  $\alpha=0.05$ ). ns – diferenças não significativas a  $p<0.05$  (post-hoc Kruskal-Wallis).

Os conteúdos em N e C são considerados como bons indicadores dos materiais de reserva de sementes. O conteúdo de C e N são características ecológicas importantes, com o conteúdo de C geralmente relacionado à capacidade de atividade fotossintética (Dietze *et al.*, 2014; Martínez-Vilalta *et al.*, 2016) e o conteúdo de N relacionado à disponibilidade de azoto para a planta (Werger e Hirose,

1991). Na Tabela 4.6, são apresentados os conteúdos em azoto (N) e em carbono (C) assim como o rácio C/N das amostras de bolota de *Q. rotundifolia* e *Q. suber*.

Foi verificada uma concentração superior em azoto nas amostras de bolota QS (1.1%) relativamente às de QR (0.9%) (Tabela 4.6). Esta diferença ( $p < 0.05$ ) na composição elementar em N (%), demonstra assim ser dependente da espécie ( $p < 0.05$ ), tal como verificado por Alegria *et al.* (2020), que apuraram valores de 0.7% e de 0.9% em bolotas QR e QS, respetivamente. O azoto é considerado como o macronutriente mais relevante pois é um constituinte de todas as proteínas e enzimas, sendo um componente indispensável para as clorofilas. A capacidade da planta para fixar azoto em quantidades suficientes é determinante para atingir teores mais elevados em proteína (funcionais e estruturais) nas suas sementes, como se confirma pela relação entre os teores proteicos verificados entre as bolotas das duas espécies (i.e., teores superiores em QS, ~7%, face a QR, ~5%). Assim, QS apresenta-se como mais eficiente na fixação de azoto face a QR. A maior eficiência de QS pode resultar de uma maior disponibilidade de fontes de azoto, já que QS é dominante em solos mais ricos (em N e água) comparativamente a QR.

**Tabela 4.6.** Conteúdo em azoto, carbono e rácio C/N das amostras de bolota das espécies *Quercus rotundifolia* e *Quercus suber*.

Espécie	N (%)	C (%)	C/N
<i>Quercus rotundifolia</i>	0.9 <sup>b</sup> ± 0.1	43.9 <sup>b</sup> ± 1.3	52.2 <sup>b</sup> ± 6.2
<i>Quercus suber</i>	1.1 <sup>a</sup> ± 0.2	43.2 <sup>a</sup> ± 1.9	40.6 <sup>a</sup> ± 7.6

Na mesma coluna, valores médios com letras diferentes apresentam diferenças significativas a  $p < 0.05$  (post-hoc Kruskal-Wallis).

Relativamente ao conteúdo em carbono (Tabela 4.6), a relação é invertida, em que as amostras de bolota QR (43.9%) apresentam valores médios superiores ( $p < 0.05$ ) aos determinados nas amostras QS (43.2%), relação suportada pelos resultados de Alegria *et al.* (2020) (45.4% e 44.5% para QR e QS, respetivamente). A maior acumulação de carbono em bolota de QR pode ser diretamente relacionada com o mecanismo fotossintético, demonstrando níveis de fixação de carbono superiores aos verificados em QS (sendo o mesmo também verificado face ao azoto). Esta acumulação reflete-se principalmente nos teores em hidratos de carbono, os produtos primários da fixação do carbono, particularmente no amido, que apresenta uma fração muito significativa nas bolotas (Vinha *et al.*, 2016). Além disso, o facto de QS ser distribuída em zonas menos áridas pode igualmente contribuir para a diferença encontrada.

O rácio C/N (Tabela 4.6), indicador da eficiência do uso de azoto, apresenta-se como significativamente superior nas amostras de bolota QR (52.2) relativamente às de QS (40.6). Este rácio também pode ser indicativo do conteúdo em hidratos de carbono nas bolotas, dos quais o amido representa uma fração muito significativa. Deste modo, demonstra-se que o maior rácio C/N em QR, está em concordância com os valores mais elevados de amido na mesma espécie, face a QS. Além dos anteriores, o rácio C/N pode ser igualmente considerado como um indicador do conteúdo lipídico dos tecidos (Fagan *et al.*, 2011), considerando que concentrações mais elevadas em lípidos são correlacionadas com rácios C/N mais elevados, dada a natureza química dos ácidos gordos ser maioritariamente constituída por carbono, com pouca a nenhuma contribuição de azoto. Desta forma, será razoável assumir que o conteúdo lipídico das bolotas QR será superior ao das QS, tendo esta relação relevância para o valor energético das bolotas de ambas as espécies. Esta relação é ainda suportada pelos teores em gordura determinados em amostras de bolota QR e QS, de ~12% e ~9%, respetivamente (informação cedida pela Doutora Carla Alegria).

Explorou-se a existência de relações entre as respostas isotópicas e elementares e as respostas morfológicas e químicas, seleccionando-se para isso as respostas integradoras determinadas para os

parâmetros morfológicos, açúcares e compostos fenólicos, apresentando-se o sumário das correlações na Tabela 4.7.

**Tabela 4.7.** Matriz de correlações de Spearman entre as respostas isotópicas e elementares e as respostas integradoras dos parâmetros morfológicos e químicos (açúcares, fenólicos e proteína) avaliadas em bolotas de *Q. rotundifolia* (QR; identificado a amarelo) e de *Q. suber* (QS; identificado a verde)

	Vol	AT	CFT	Prot	$\delta^{15}\text{N}$	$\delta^{13}\text{C}$	N	C	C/N	
<b>Vol</b>	1.00	0.38	-0.10	-0.20	0.28	-0.17	-0.20	0.01	0.21	
<b>AT</b>	0.04	1.00	0.04	<b>-0.40**</b>	-0.20	0.13	<b>-0.40**</b>	<b>-0.34*</b>	<b>0.34*</b>	
<b>CFT</b>	0.07	-0.04	1.00	-0.23	<b>-0.41*</b>	-0.18	-0.23	-0.11	0.18	
<b>Prot</b>	-0.06	-0.02	-0.28	1.00	<b>0.72***</b>	0.27	1.00	-0.08	<b>-0.97***</b>	
<b><math>\delta^{15}\text{N}</math></b>	-0.12	-0.09	-0.10	0.21	1.00	0.10	0.21	0.14	-0.17	<b>QR</b>
<b><math>\delta^{13}\text{C}</math></b>	-0.04	0.00	<b>0.41**</b>	0.07	0.13	1.00	0.07	-0.07	-0.08	
<b>N</b>	-0.06	-0.02	-0.28	1.00	<b>0.72***</b>	0.27	1.00	<b>0.31*</b>	<b>-0.95***</b>	
<b>C</b>	-0.18	-0.26	-0.01	<b>0.31*</b>	-0.07	0.37	-0.08	1.00	-0.03	
<b>C/N</b>	-0.02	-0.07	0.29	<b>-0.95***</b>	<b>-0.71***</b>	-0.18	<b>-0.97***</b>	0.29	1.00	

Correlações significativas são destacadas a negrito. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ . Vol – volume da bolota ( $\text{cm}^3$ ); AT – açúcares totais (mg/g); CFT – conteúdo fenólico total (mg EAG/g);  $\delta^{15}\text{N}$  – conteúdo em isótopos estáveis de azoto (‰);  $\delta^{13}\text{C}$  – conteúdo em isótopos estáveis de carbono (‰); N – conteúdo em azoto (%); C – conteúdo em carbono (%); C/N – rácio entre carbono e azoto.

Como é possível verificar a partir da Tabela 4.7, e em relação a QR, não foi verificada qualquer correlação entre  $\delta^{13}\text{C}$  com qualquer das respostas integradoras consideradas. Em QS, as variações em  $\delta^{13}\text{C}$  foram correlacionadas ( $p < 0.05$ ) com o CFT. Foi igualmente verificado que, em QR,  $\delta^{15}\text{N}$  apenas se correlacionou de forma significativa com o CFT e o teor em proteína, enquanto que em QS a assinatura  $\delta^{15}\text{N}$  apresentou correlações significativas com o conteúdo em N (%) e rácio C/N. O conteúdo em N em bolotas QR apresentou uma correlação significativa com o teor em açúcares totais, proteína (como expectável), conteúdo em C e razão C/N. Em QS, além da já mencionada correlação com a assinatura  $\delta^{15}\text{N}$ , o conteúdo em N apresentou, sem surpresa, uma elevada correlação com C/N. Relativamente ao conteúdo em C das bolotas QR, encontraram-se correlações com o teor em açúcares totais (além da já mencionada correlação com N), enquanto que nas bolotas QS, apenas se encontrou uma correlação com significado com o teor proteico. Por fim, a razão C/N das bolotas QR, além das correlações já assinaladas, é também correlacionado com os açúcares totais e teores proteicos, apresentado a mesma variável em bolotas QS correlações com o teor proteico além das previamente identificadas.

## 4.2 Efeitos das Condições Climáticas e Ambientais nas Características Morfológicas, Químicas e Isotópicas da Bolota em Função da Espécie

Neste capítulo são avaliados os efeitos das condições ambientais sobre as respostas morfológicas, químicas e isotópicas da bolota das duas espécies (*Q. rotundifolia* e *Q. suber*), com o objetivo de identificar a influência das condições ambientais (aridez, potencial de evapotranspiração) e climáticas (variáveis bioclimáticas) na qualidade e comportamento ecofisiológico das bolotas de ambas as espécies. Para compreender as interações ecossistema-bolota e consequências na qualidade das bolotas para fins alimentares foram seguidas duas abordagens: a) avaliação do efeito “espécie x classe de aridez”, definidas pela aridez verificada nos pontos de amostragem de ambas as espécies; e b) avaliação do efeito das variáveis bioclimáticas e ambientais, nas respostas morfológicas, químicas e isotópicas da bolota. Pretende-se assim identificar locais com potencialidade para colheita de bolota

para fins alimentares e/ou diferentes aptidões tecnológicas e verificar a utilização da bolota como um indicador ecofisiológico do “status” do ecossistema Montado.

#### 4.2.1 Integração das Espécies no Contexto Ambiental

Na sequência da avaliação das características da bolota em função da espécie, foram encontradas evidências de que o contexto ambiental, nomeadamente as diferenças de aridez nos locais de amostragem, impactam as respostas analisadas. Assim, pretendeu-se verificar, de forma integradora, se as diferenças entre as bolotas das duas espécies se mantêm ou são claramente descritas considerando a discriminação das espécies pelas condições de aridez verificadas nos locais de amostragem. A classificação climática dos locais de amostragem resulta de diferentes fatores onde a (disponibilidade em) água é chave para compreender a aridez, assim como as interações clima-vegetação-solo. Com efeito, o índice de aridez, quantificado pela comparação da média da precipitação (longo prazo) com a média do potencial de evapotranspiração (longo prazo; medida da capacidade atmosférica remover água de, e.g., do solo e coberto vegetal, por evaporação e transpiração das plantas), é uma medida amplamente utilizada para medir a “secura” (*dryness*) do clima de um local específico. O índice de aridez permite a classificação de seis tipologias de *drylands* (<https://wad.jrc.ec.europa.eu/patternsaridity>):

Classe de aridez (ou classe climática)	Índice de aridez (IA)
Hiper-árido	$IA < 0.05$
Árido	$0.05 \leq IA < 0.2$
Semi-árido	$0.2 \leq IA < 0.5$
Seco sub-húmido	$0.5 \leq IA < 0.65$
Húmido	$IA \geq 0.65$
Frio	$PET < 400 \text{ mm}$

Como referido nos materiais e métodos, as amostras de bolota foram recolhidas num gradiente espacial de aridez ( $0.423 \leq IA \leq 0.801$ ), resultando numa categorização em diferentes classes climáticas, variando entre o semi-árido e o húmido, apresentando-se o resumo desta classificação na Tabela 4.8.

**Tabela 4.8.** Classes climáticas dos locais de amostragem de bolota de *Q. rotundifolia* e de *Q. suber*.

Espécie	Classe de aridez	Intervalo IA	n
<i>Q. rotundifolia</i>	Seco sub-húmido	$0.504 \leq IA \leq 0.602$	19
	Semi-árido	$0.423 \leq IA \leq 0.485$	23
	Húmido*	0.701; 0.801	2
<i>Q. suber</i>	Seco sub-húmido	$0.505 \leq IA \leq 0.636$	17
	Semi-árido	$0.431 \leq IA \leq 0.485$	6

\*Verificado apenas em dois pontos de amostragem.

Desta classificação e para efeitos de comparação entre as espécies, a classe “húmido” foi excluída da análise uma vez que essa condição foi apenas verificada em dois locais de amostragem e ambos referentes às amostras de bolota de *Q. suber*, resultando num conjunto final de dados definido por  $n_{QR \text{ semi-árido}}=23$ ,  $n_{QR \text{ Seco sub-húmido}}=19$ ,  $n_{QS \text{ semi-árido}}=6$ ,  $n_{QS \text{ Seco sub-húmido}}=17$ . Assim, o efeito “espécie x classe de aridez” foi explorado pela comparação das respostas morfológicas, químicas e isotópicas da bolota das duas espécies com recurso a testes não paramétricos (Kruskal–Wallis *one-way analysis of*



variance; Spearman's rho) e a integração das respostas das bolotas QR e QS nos respectivos contextos climáticos alcançada por análise multivariada (análise de componentes principais, PCA). É pretendido assim detalhar a qualidade das bolotas e respostas ecofisiológicas atendendo quer à espécie como ao contexto climático, auxiliando a definição das condições que maximizam a qualidade alimentar ou outras alternativas de valorização deste fruto da floresta mediterrânica.

#### 4.2.1.1 Respostas Morfológicas

Na Tabela 4.9 são apresentados os valores das medidas morfológicas nas amostras de bolota QR e QS sob a influência das condições climáticas.

**Tabela 4.9.** Parâmetros morfológicos das amostras de bolota de *Q. rotundifolia* e de *Q. suber* de acordo com a classe de aridez.

Espécie	Classe de Aridez	Peso (g)	Comprimento (mm)	Diâmetro (mm)	Volume (cm <sup>3</sup> )
<i>Q. rotundifolia</i>	Seco sub-húmido	8.3 <sup>a</sup> ± 2.5	38.0 <sup>c</sup> ± 4.3	16.7 <sup>ns</sup> ± 2.3	5.7 <sup>b</sup> ± 1.8
	Semi-árido	8.0 <sup>a</sup> ± 2.5	39.0 <sup>d</sup> ± 4.5	16.5 <sup>ns</sup> ± 2.3	5.7 <sup>b</sup> ± 2.0
<i>Q. suber</i>	Seco sub-húmido	7.1 <sup>b</sup> ± 2.4	32.3 <sup>a</sup> ± 4.5	16.7 <sup>ns</sup> ± 2.4	4.9 <sup>a</sup> ± 1.8
	Semi-árido	8.1 <sup>ab</sup> ± 3.2	33.4 <sup>b</sup> ± 5.4	16.3 <sup>ns</sup> ± 2.2	4.9 <sup>a</sup> ± 2.0

Na mesma coluna, valores médios com letras diferentes apresentam diferenças significativas a  $p < 0.05$  (post-hoc Kruskal-Wallis). ns – não significativo.

De acordo com os resultados obtidos, verifica-se que as variações de peso das amostras de bolota não são influenciadas por qualquer dos efeitos singulares avaliados, registando-se apenas diferenças determinadas pela combinação dos efeitos. O peso das bolotas não variou entre classes climáticas de uma mesma espécie ( $p > 0.05$ ), sendo a única diferença com significado estatístico registada entre as amostras de bolotas QS x Seco sub-húmido e ambos os tipos de amostra QR (7.1 g vs. ~8 g para QS e QR, respetivamente,  $p < 0.05$ ) (Tabela 4.9). No entanto, o comprimento das amostras de bolotas foi significativamente influenciado por ambas as variáveis independentes: as amostras QR apresentam-se como significativamente maiores do que as QS (38-39 mm vs. 32-33 mm, para QR e QS, respetivamente,  $p < 0.05$ ), verificando-se igualmente um aumento ( $p < 0.05$ ) na dependência do aumento da aridez para ambas as espécies (Tabela 4.9). As variações do diâmetro das amostras de bolota apresentam-se como não significativas na comparação entre espécies e classes climáticas, com volumes de ~16.5 cm<sup>3</sup> para qualquer das amostras avaliadas. O efeito da espécie é notório na determinação dos volumes das amostras de bolota, apresentando as amostras QR volumes significativamente superiores às de QS (5.7 cm<sup>3</sup> vs. 4.9 cm<sup>3</sup>, respetivamente,  $p < 0.05$ ), sem qualquer influência da classe de aridez ( $p > 0.05$ ).

Na bibliografia e como já discutido, encontram-se valores semelhantes aos dos parâmetros avaliados nas bolotas QR e QS (Alegria *et al.*, 2020; Estévez *et al.*, 2007). A influência da aridez nestes parâmetros é ainda discutida em Alegria *et al.* (2020), onde verificaram correlações negativas ( $p < 0.05$ ) entre o índice de aridez, o peso e o comprimento das bolotas de *Q. suber*, ou seja, quanto mais árido o local (Aridez → I-IA), maior o peso e o comprimento da bolota de QS. Esta correlação confirma o efeito observado de aumento de peso e comprimento entre bolotas QS amostradas em locais seco sub-húmidos e semi-áridos (Tabela 4.9). Em *Q. rotundifolia*, Alegria *et al.* (2020) verificou que o peso e comprimento das bolotas não é influenciado de forma significativa pelo IA, contrapondo os resultados agora obtidos no que se refere ao comprimento das bolotas QR (Tabela 4.9). Embora também não fossem determinadas diferenças de peso entre classes climáticas nas amostras de bolota QR, o comprimento das bolotas foi distinto entre classes, onde as amostras provenientes de locais semi-áridos são maiores que as de locais

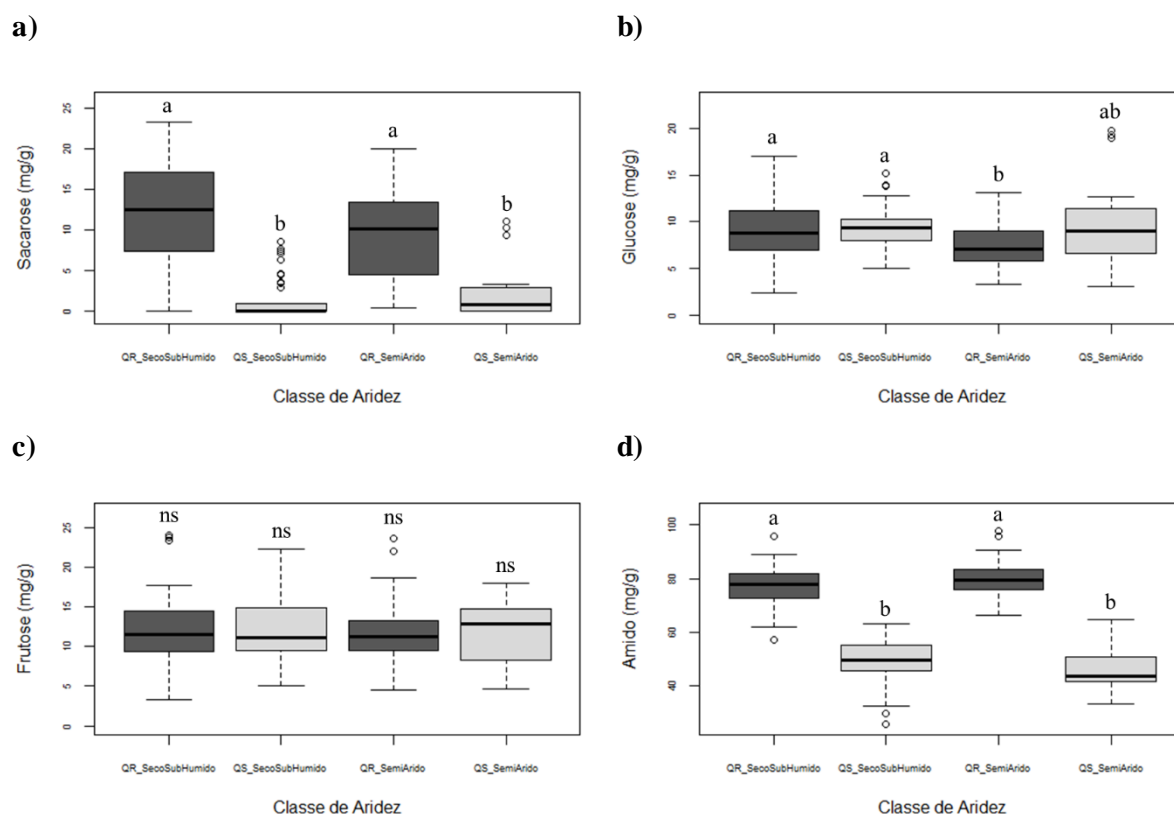
menos áridos. Este resultado sugere, assim, uma correlação negativa com o IA que, embora também fosse sugerida pelos resultados de Alegria *et al.* (2020), a mesma não apresentou significado estatístico. As diferenças não significativas entre o diâmetro e o volume das bolotas entre as classes climáticas (independentemente da espécie; Tabela 4.9) são igualmente suportadas pelo estudo de Alegria *et al.* (2020). A variação dos parâmetros morfológicos de bolotas de *Q. rotundifolia* ao longo de um gradiente de aridez foi estudada por de Oliveira (2014), não tendo encontrado nenhum padrão de variação associado à aridez dos locais de amostragem. Já Nunes *et al.* (2017) conclui que o peso da bolota de *Q. rotundifolia* não varia em função da aridez, tal como agora verificado.

#### 4.2.1.2 Respostas Químicas

##### Açúcares

A quantificação dos teores de sacarose, glucose, frutose e amido, sob influência da espécie de bolota e distribuição climática é apresentada na Figura 4.7.

As diferenças encontradas entre os teores de sacarose das amostras de bolota (Figura 4.7a) foram apenas determinadas pela espécie, apresentando as amostras QR teores significativamente superiores (10.82 mg/g) aos de QS (1.77 mg/g), sem qualquer influência das classes climáticas.

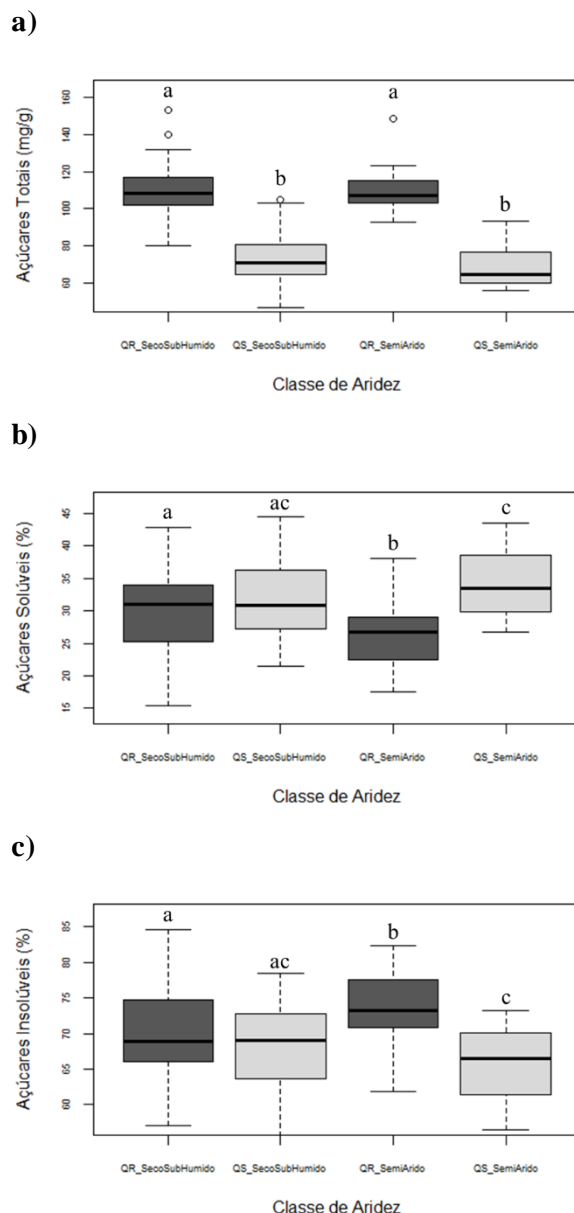


**Figura 4.7.** Box-plots do conteúdo em sacarose, glucose, frutose e amido de bolota de *Q. rotundifolia* e *Q. suber* de acordo com a classe de aridez. Diferenças significativas entre as amostras de bolota são indicadas com letras diferentes (post-hoc Kruskal-Wallis,  $\alpha=0.05$ ). ns – não significativo.

Relativamente aos teores em glucose (Figura 4.7b), as amostras QR colhidas em pontos de amostragem classificados como semi-áridos apresentam teores significativamente inferiores aos determinados nas amostras dos locais seco sub-húmidos (7.3 vs. 9.1 mg/g,  $p<0.05$ , respetivamente). Os teores de glucose determinados nas amostras QS não verificam diferenças entre classes climáticas (~9.5 mg/g), sendo os mesmos semelhantes ( $p>0.05$ ) aos determinados em QR na condição seco sub-

húmido. Confirmam-se as diferenças não significativas entre os teores de frutose das amostras de ambas as espécies (11.4-12.4 mg/g;  $p>0.05$ ), sem qualquer influência das condições climáticas (Figura 4.7c). No estudo de Abreu *et al.* (2019) é relatada uma variação significativa da frutose em relação à aridez do terreno, informação contrastante àquela que o presente estudo encontrou. À semelhança dos resultados obtidos relativamente aos teores em sacarose, as diferenças entre os teores de amido (Figura 4.7d) das amostras analisadas apenas foram influenciadas pela espécie, não se registando diferenças atribuídas à classe de aridez. De igual forma, os teores de amido nas amostras QR (77-80 mg EG/g) foram superiores ( $p<0.05$ ) aos registados nas amostras QS (46-50 mg EG/g). Este resultado suporta a exploração de *Q. rotundifolia* como matriz para a extração de amido como ingrediente alimentar para a produção de diferentes tipos de produtos.

Na Figura 4.8 apresentam-se as variações em açúcares totais (Figura 4.8a) e os contributos (%), (Figura 4.8b e c) em açúcares solúveis (sacarose, glucose e frutose) e açúcares insolúveis (amido), das amostras de bolota QR e QS colhidas em locais classificados como sub-húmidos e semi-áridos.



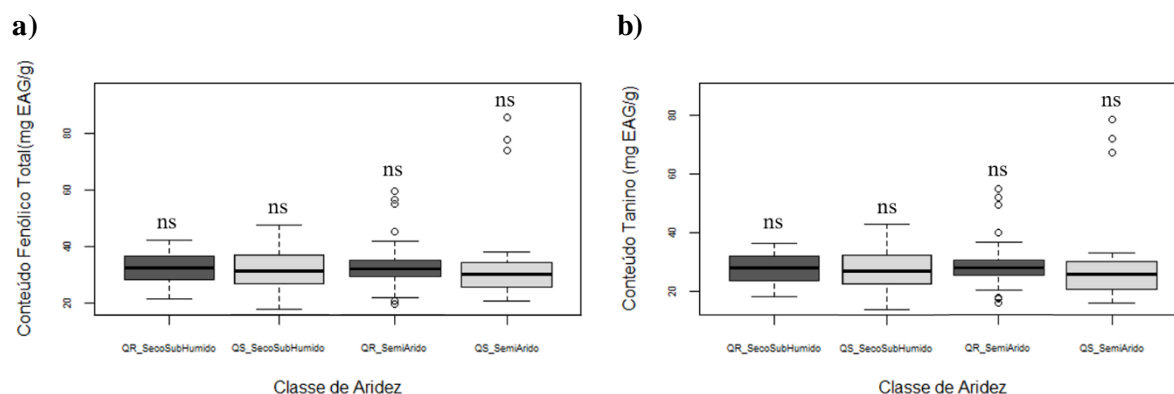
**Figura 4.8.** Box-plots do conteúdo em açúcares totais (a), contributos percentuais de açúcares solúveis (b) e de açúcares insolúveis (c) de bolota de *Q. rotundifolia* e *Q. suber* de acordo com a classe de aridez. Diferenças significativas entre as amostras de bolota são indicadas com letras diferentes (post-hoc Kruskal-Wallis,  $\alpha=0.05$ ).

Como se observa na Figura 4.8a, confirmam-se as diferenças significativas entre no conteúdo em açúcares total das amostras de bolota QR e QS ( $p<0.05$ ). No entanto, sob a influência da classe de aridez, não foram registadas diferenças ( $p>0.05$ ) no conteúdo em açúcares total, independentemente da espécie, registando-se valores de 108.6-109.8 mg/g para QR e de 69.7-72.8 mg/g para QS. Todavia, os contributos das frações solúvel e insolúvel das amostras de bolota foram significativamente influenciados pelo efeito combinado "espécie x classe de aridez" (Figura 4.8b e Figura 4.8c). Destaca-se o aumento significativo da fração insolúvel de QR e, inversamente, a diminuição ( $p<0.05$ ) da fração solúvel com o aumento da aridez dos locais de amostragem, situação sem significado nas amostras QS ( $p>0.05$ ), observando-se a manutenção de ambas as frações independentemente da classe de aridez (31.7-34.1% e 65.9-68.3% para a fração solúvel e insolúvel, respetivamente). Abreu *et al.* (2019) verificaram em *Q. rotundifolia* um aumento dos teores de açúcares solúveis com a aridez, situação contrária à verificada neste trabalho. O aumento da fração insolúvel, correspondendo ao contributo do

amido, com o aumento da aridez, poderá ser tida como um indicador de uma estratégia adaptativa de QR a condições mais áridas, onde a escassez de água poderá contribuir para um maior investimento da planta em compostos de reserva para aumentar o sucesso reprodutivo (de Oliveira, 2014).

### Compostos Fenólicos

Os resultados das variações do conteúdo fenólico total (CFT) e conteúdo em taninos (CT) das amostras de bolota QR e QS nas diferentes condições climáticas é apresentado na Figura 4.9.



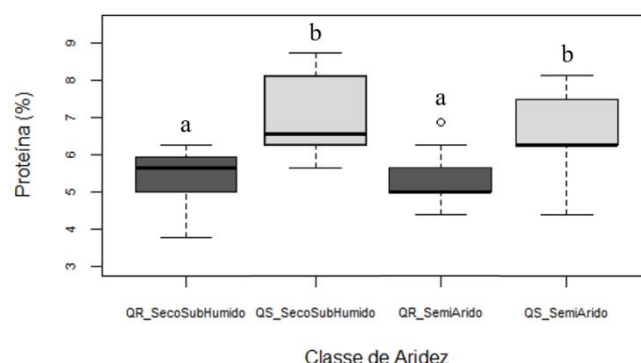
**Figura 4.9.** Box-plots do conteúdo fenólico total e conteúdo tanino de bolota de *Q. rotundifolia* e *Q. suber* de acordo com a classe de aridez. ns – não significativo (post-hoc Kruskal-Wallis,  $\alpha=0.05$ ).

O conteúdo fenólico total das amostras de bolota variou entre 31.5 e 36.7 mg EAG/g ( $p>0.05$ ; Figura 4.9a) e o conteúdo em taninos entre 27.1 e 32.0 mg EAG/g ( $p>0.05$ , Figura 4.9b). As amostras de bolota de ambas as espécies apresentaram variações não significativas nos quantitativos fenólicos entre classes climáticas, embora as bolotas de QS recolhidas em condições semi-áridas apresentem CFT (Figura 4.9a) e CT (Figura 4.9b) cerca 10% superiores ( $p>0.05$ ) a QR nas mesmas condições, indicando um efeito positivo da classe de aridez sobre esta resposta. De acordo, as diferenças registadas em CFT e em CT foram determinadas como não significativas na dependência do efeito singular espécie e combinado "espécie x classe de aridez", mas o efeito classe de aridez apresentou-se como significativo ( $p<0.05$ ) para ambas as respostas. Este efeito de "aumento" das frações fenólicas com a aridez poderá estar relacionado com mecanismos de defesa das plantas a situações de stress (a)biótico, dado o importante papel destes compostos no sistema de defesa das plantas implicando respostas adaptativas aos stresses impostos, neste caso, condições de seca e/ou predação. Independentemente da espécie ou classe de aridez, a bolota do Montado apresenta teores fenólicos expressivos e que suportam a sua exploração como potencial fonte de extração de compostos bioativos pela capacidade antioxidante associada. Na bibliografia, é reportado que, para bolotas de outras espécies de *Quercus*, a elevada atividade antioxidante dos extratos fenólicos obtidos não é diminuída após tratamentos térmicos (200 °C/10-15 min), pelo contrário, é aumentada, em consequência da manutenção ou aumento do CFT, embora se verifique uma diminuição no conteúdo em taninos (Rakić *et al.*, 2004; Rakić *et al.*, 2007). Este comportamento é explicado pela degradação térmica dos taninos e consequente aumento do conteúdo fenólico não tanino, nomeadamente o ácido gálico. De acordo com estes estudos e os quantitativos verificados nas bolotas, ligeiramente superiores em condições mais áridas, é demonstrado o potencial das bolotas como matriz de compostos com atividade biológica.

### Teor Proteico

O teor em proteína das amostras de bolota é apresentado na Figura 4.10, onde são diferenças atribuídas ao efeito espécie ( $p<0.05$ ), mas sem influência da classe de aridez ( $p>0.05$ ). Assim como

neste estudo, de Oliveira (2014) verificou uma manutenção dos teores proteicos de bolota de *Q. rotundifolia* na dependência do gradiente de aridez.



**Figura 4.10.** Box-plots do conteúdo percentual em proteína de bolota de *Q. rotundifolia* e *Q. suber* de acordo com a classe de aridez. Diferenças significativas entre as amostras de bolota são indicadas com letras diferentes (post-hoc Kruskal-Wallis,  $\alpha=0.05$ ).

#### 4.2.1.3 Respostas Isotópicas e Elementares

Os valores das razões isotópicas  $\delta^{15}\text{N}$  e  $\delta^{13}\text{C}$ , conteúdo em azoto e carbono e razão C/N para as amostras de bolota de ambas as espécies sob a influência das condições climáticas, são apresentados na Tabela 4.10.

**Tabela 4.10.** Composição isotópica em  $\delta^{15}\text{N}$  e  $\delta^{13}\text{C}$ , conteúdos em azoto (N) e carbono (C), e rácio C/N em bolota de *Q. rotundifolia* e *Q. suber* de acordo com a classe de aridez.

Espécie	Classe de aridez	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	N (%)	C (%)	C/N
<i>Q. rotundifolia</i>	Seco sub-húmido	$1.0^{ab} \pm 1.6$	$-25.5^{ns} \pm 0.7$	$0.9^a \pm 0.1$	$43.7^{ab} \pm 1.6$	$52.2^b \pm 6.8$
	Semi-árido	$1.6^b \pm 1.6$	$-25.6^{ns} \pm 1.0$	$0.9^a \pm 0.1$	$44.0^b \pm 0.8$	$52.3^b \pm 5.5$
<i>Q. suber</i>	Seco sub-húmido	$0.6^a \pm 1.3$	$-25.6^{ns} \pm 1.1$	$1.1^b \pm 0.2$	$43.0^a \pm 2.1$	$39.6^a \pm 6.4$
	Semi-árido	$1.1^{ab} \pm 1.33$	$-25.9^{ns} \pm 0.7$	$1.1^b \pm 0.2$	$43.7^{ab} \pm 1.5$	$42.7^a \pm 10.0$

Na mesma coluna, valores médios com letras diferentes apresentam diferenças significativas a  $p < 0.05$  (post-hoc Kruskal-Wallis).

Em relação à razão  $\delta^{15}\text{N}$  registada nas amostras de bolota de diferentes origens geográficas, apenas se verificou uma influência significativa do efeito combinado “espécie x classe de aridez”, em que “QR x Semi-árido” demonstra valores superiores a “QS x Seco sub-húmido”. Quanto à classe de aridez, foi apresentada uma manutenção nos valores, com grande variabilidade nestes, não permitindo afirmar que há um aumento significativo destes teores com a aridez (Tabela 4.10). Já Alegria *et al.* (2020) verificaram um enriquecimento em  $^{15}\text{N}$  de bolota com o aumento da aridez. Nesse estudo foi verificado que, embora as diferenças entre os valores de  $\delta^{15}\text{N}$  fossem não significativas entre as espécies QR e QS, QR apresentava valores aparentemente ligeiramente superiores aos de QS. As assinaturas  $\delta^{13}\text{C}$  não apresentaram diferenças entre amostras, independentemente da espécie e classe de aridez, com valores entre  $-25.9\text{‰}$  e  $-25.5\text{‰}$ , encontrando-se no intervalo avaliado em Alegria *et al.* (2020), independentemente da espécie ou índice de aridez.

As variações em azoto foram determinadas pela espécie de bolota ( $p < 0.05$ ), sem influência da classe de aridez (Tabela 4.10). O conteúdo em azoto, de 0.9% para as amostras QR e de 1.1% para as amostras QS e independentemente da classe de aridez, tal como referido anteriormente, é semelhante ao verificado em Alegria *et al.* (2020) que reportam conteúdos em azoto inferiores em QR face a QS. Estes

resultados contrastam com os de Delgado-Baquerizo *et al.* (2013), que concluem que a correlação mais forte com a aridez é a disponibilidade de azoto. Segundo os autores, a correlação negativa encontrada entre N e a aridez indica que, com o aumento da aridez, a disponibilidade em azoto diminui afetando consequentemente os padrões de aquisição de nutrientes das plantas. Considerando os atuais cenários das alterações climáticas, esta é uma situação preocupante pelo aumento de aridez das regiões, nomeadamente no Montado Alentejano (Alegria *et al.*, 2020). Os conteúdos em carbono das amostras de bolota variaram entre 43 e 44%, apresentando as amostras “QR x Semi-árido” teores superiores face a “QS x Seco sub-húmido” (Tabela 4.10). Em Alegria *et al.* (2020) foi reportada uma situação onde foi verificado que as diferenças entre C das espécies, superiores ( $p < 0.05$ ) em QR face a QS, poderiam ser explicadas pelas distintas condições climáticas verificadas entre os locais de amostragem QR e QS. A razão C/N das amostras de bolota apresentaram diferenças atribuídas ao efeito espécie ( $p < 0.05$ ), observando-se a manutenção dos valores por espécie entre classes climáticas ( $p > 0.05$ ).

#### 4.2.1.4 Análise de Componentes Principais

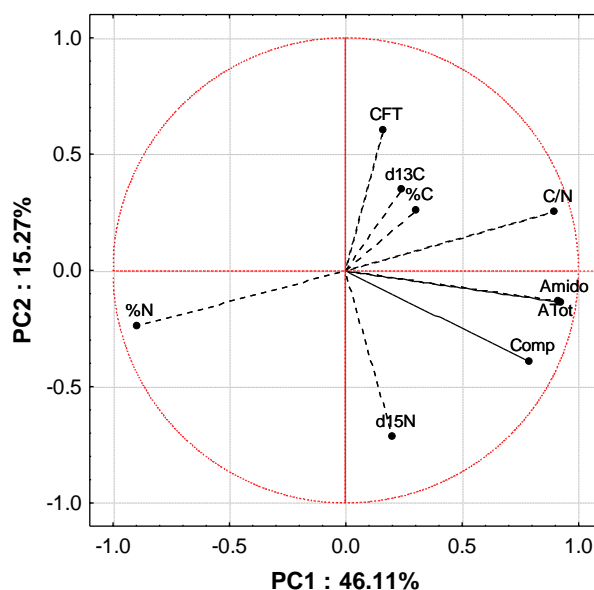
Foi utilizada uma análise de componentes principais (PCA) para explorar quais as características morfológicas, químicas e isotópicas que melhor descrevem as diferenças entre espécies sob influência das respetivas classes climáticas. O conjunto de dados incluiu quatro categorias de variáveis que identificam amostras QS e QR e respetivas classificações nas classes climáticas (seco sub-húmido e semi-árido). As variáveis quantitativas corresponderam, após compromisso de variáveis não auto-correlacionadas por espécie, à composição em açúcares (amido e açúcares totais), respostas morfológicas (comprimento), respostas isotópicas e elementares ( $\delta^{15}\text{N}$ ,  $\delta^{13}\text{C}$ , conteúdos em N e C, e rácio C/N) e conteúdo fenólico total. A matriz de dados resultante contém 65 amostras e 9 variáveis codificadas como se apresenta na Tabela 4.11.

**Tabela 4.11.** Variáveis e amostras codificadas utilizadas para a análise em componentes principais (PCA) para avaliação dos parâmetros de qualidade e ecofisiológicos de bolota de duas espécies sob a influência da classe de aridez.

Variáveis		Códigos
Amido (mg/g)		Amido
Açúcares totais (mg/g)		ATot
Comprimento (mm)		Comp
$\delta^{15}\text{N}$ (‰)		d15N
$\delta^{13}\text{C}$ (‰)		d13C
Conteúdo em N (%)		%N
Conteúdo em C (%)		%C
C/N		C/N
Conteúdo fenólico total (mg EAG/g)		CFT
Amostras		Códigos
<i>Q. rotundifolia</i>	Seco sub-húmido	QR_Seco sub-húmido
	Semi-árido	QR_Semi-árido
<i>Q. suber</i>	Seco sub-húmido	QS_Seco sub-húmido
	Semi-árido	QS_Semi-árido

A PCA (Figura 4.11) permitiu explicar 61.39% da variabilidade dos dados originais nas duas primeiras dimensões (componentes principais, PC, 1 e 2), o que embora seja insuficiente para ser

considerado adequado para definir um bom modelo para fins qualitativos (variância explicada <70% da informação original acumulada nos dois primeiros PCs; Larrigaudière *et al.*, 2004), permite estabelecer relações entre as respostas que contribuem para a separação das espécies agrupadas por classe de aridez.

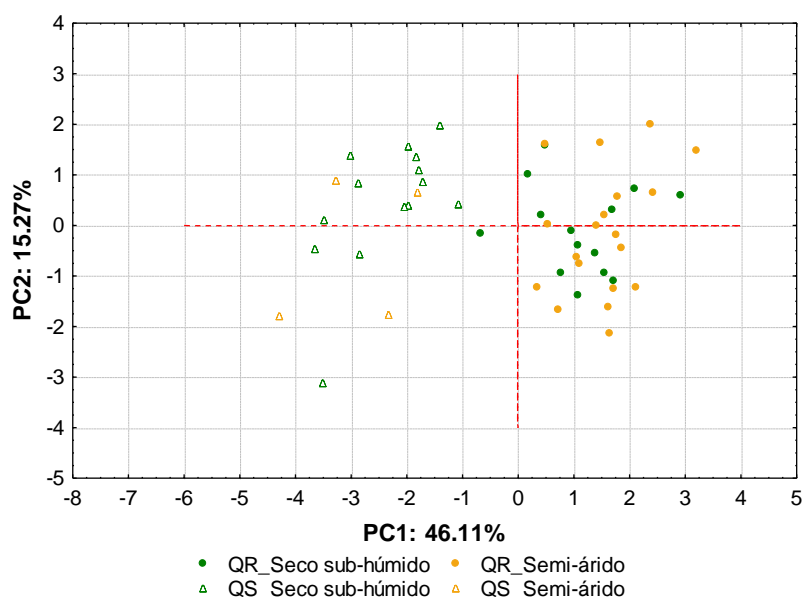


**Figura 4.11.** Biplot PC1 x PC2 sobre as variáveis morfológicas, químicas e isotópicas de bolota QR e QS de acordo com a classe de aridez. A codificação das variáveis é apresentada na Tabela 4.11.

O PC1 (46.1%), correlaciona-se de forma significativa com os quantitativos em açúcares ( $r_{\text{amido}}=0.95$  e  $r_{\text{ATot}}=0.91$ ), o comprimento das bolotas ( $r_{\text{comp}}=0.79$ ), o conteúdo em N ( $r_N=-0.90$ ) e o rácio C/N ( $r_{\text{C/N}}=0.90$ ). Este componente, parece relacionar-se com os processos de aquisição de N (%N, de conteúdos elevados para reduzidos), onde o correspondente aumento no comprimento e quantitativos em açúcares sugere a maior incorporação nestes compostos energéticos. No entanto, no PC2 (15.3%) apenas se verifica uma associação significativa,  $\delta^{15}\text{N}$  ( $r_{\text{d15N}}=-0.72$ ), sendo indicativa de que os processos de alocação e eficiência de uso de N e respetivas fontes são desacoplados do mecanismo descrito pelo PC1.

A projeção das amostras analisadas no espaço de PC1 e PC2 (Figura 4.12) evidência uma clara distinção entre as espécies de *Quercus*.





**Figura 4.12.** Biplot PC1 x PC2 (score plot) das amostras de bolota de QR e QS de acordo com a classe de aridez.

Independentemente da classe de aridez, as amostras de bolota QS (símbolos abertos) são segregadas das QR (símbolos fechados), tomando como referência o eixo definido pelo PC1 (Figura 4.12). Esta segregação demonstra que as bolotas de QS são mais pequenas que as QR, apresentam menores quantitativos em açúcares (amido e totais) e maiores em N. Já o contributo do PC2, isto é, de  $\delta^{15}\text{N}$  para esta segregação não é tão claro, onde a distribuição aleatória das amostras (por espécie) não permite a descrição de um comportamento claramente definido, talvez pela plasticidade adquirida pelas espécies. No entanto, permite verificar que as amostras de bolota QR apresentam na generalidade valores mais enriquecidos em  $^{15}\text{N}$  que as de QS. Com base nestas relações, a classe de aridez parece não ter influência na distribuição das amostras no espaço definido pelo PC1 e PC2. A fraca segregação das classes climáticas pode ser justificada quer pela proximidade dos valores do índice de aridez verificados em cada ponto de amostragem que, apesar de caracterizarem diferentes classes climáticas, não representam a gama de variação completa das classes.

#### 4.2.2 Influência da Variação Climática em Função da Espécie nas Respostas Morfológicas, Químicas e Isotópicas

Conforme descrito nos Materiais e Métodos, para efeitos da avaliação do efeito das variáveis bioclimáticas e ambientais sobre as respostas (variáveis dependentes) determinadas em QR e em QS, foi efetuada uma avaliação preliminar da (multi)colinearidade entre variáveis explicativas. Após avaliação da (multi)colinearidade entre as 19 variáveis bioclimáticas, PET e índice de aridez (cf. Anexo 4, Tabela A 13), foram selecionadas como variáveis explicativas para as variações das respostas avaliadas em amostras de bolota de *Q. rotundifolia*, o **índice de aridez (IA)**, a **temperatura média anual** (Bio01), a **isotermalidade** (Bio03), a **amplitude da temperatura anual** (Bio07), a **precipitação no mês mais húmido** (Bio13) e a **precipitação no mês mais seco** (Bio14). Para *Q. suber*, e seguindo a mesma abordagem, foram selecionadas cinco variáveis explicativas: a **temperatura média anual** (Bio01), a **isotermalidade** (Bio03), a **temperatura mínima do mês mais frio** (Bio06), a **precipitação anual** (Bio12) e a **precipitação sazonal** (Bio15).

A influência da variação climática/ambiental na qualidade da bolota em função da espécie foi verificada com recurso a modelos de regressão múltipla aplicados ao conjunto de dados brutos de ambas

as espécies. As variáveis climáticas/ambientais selecionadas foram consideradas como o conjunto de preditores (variáveis independentes) e a descrição da influência destas sobre as respostas determinadas nas amostras de bolota (por espécie) avaliada com os procedimentos de regressão “passo à frente” (*forward stepwise*) usuais para a seleção do modelo de regressão linear múltipla. Independentemente da variância explicada, apenas os modelos com significado estatístico ( $p < 0.05$ ) foram considerados para efeitos de discussão, apresentando-se o resumo dos mesmos nas Tabela 4.12 e Tabela 4.13, para *Q. rotundifolia* e *Q. suber*, respetivamente. Os modelos sem significado estatístico e respetivas equações são apresentados em anexo (Anexo 4, Tabela A 25, Tabela A 26 e Tabela A 27, respetivamente).

**Tabela 4.12.** Modelos de regressão múltipla com significado estatístico para as respostas de bolota de *Q. rotundifolia*.

		Glucose			Frutose			Amido		
		$\beta$	$\beta$ SE	$R^2$	$\beta$	$\beta$ SE	$R^2$	$\beta$	$\beta$ SE	$R^2$
Preditores	Bio01	<b>-0.49*</b>	0.22	0.58	<b>0.77***</b>	0.19	0.50	[removida]		
	Bio03	[removida]			-0.21	0.14	0.04	[removida]		
	Bio07	-0.36	0.20	0.53	<b>-0.39*</b>	0.17	0.40	[removida]		
	Bio13	<b>0.56*</b>	0.24	0.68	[removida]			[removida]		
	Bio14	<b>0.69*</b>	0.29	0.76	[removida]			[removida]		
	IA	<b>-1.1**</b>	0.38	0.86	<b>-0.75**</b>	0.22	0.63	<b>-0.37*</b>	0.15	0.00
Regressão	R múltiplo		0.55			0.58			0.37	
	$R^2$		0.30			0.34			0.14	
	$R^2_{aj}$		0.20			0.27			0.12	
	F		3.06			4.79			6.39	
	p		0.021*			0.003**			0.016*	
	SE da estimativa		2.73			3.30			4.86	
		Açúcares solúveis			Açúcares insolúveis					
		$\beta$	$\beta$ SE	$R^2$	$\beta$	$\beta$ SE	$R^2$			
Preditores	Bio01	<b>-0.70**</b>	0.20	0.58	<b>0.70**</b>	0.20	0.58			
	Bio03	<b>-0.36*</b>	0.14	0.09	<b>0.36*</b>	0.14	0.09			
	Bio07	-0.37	0.19	0.50	0.37	0.19	0.50			
	Bio13	0.27	0.21	0.72	-0.27	0.21	0.59			
	Bio14	[removida]			[removida]					
	IA	<b>-0.58*</b>	0.25	0.59	<b>0.58*</b>	0.25	0.72			
Regressão	R múltiplo		0.62			0.62				
	$R^2$		0.38			0.38				
	$R^2_{aj}$		0.29			0.29				
	F		4.38			4.38				
	p		0.003**			0.003**				
	SE da estimativa		4.74			4.74				

**Tabela 4.13.** Modelos de regressão múltipla com significado estatístico para as respostas de bolota de *Q. suber*.

		<b>Sacarose</b>			<b>Amido</b>			<b>Açúcares solúveis</b>			<b>Açúcares insolúveis</b>		
		$\beta$	$\beta$ SE	R <sup>2</sup>	$\beta$	$\beta$ SE	R <sup>2</sup>	$\beta$	$\beta$ SE	R <sup>2</sup>	$\beta$	$\beta$ SE	R <sup>2</sup>
<b>Preditores</b>	Bio01	-1.19**	0.37	0.79	-1.28**	0.38	0.80	-0.09	0.38	0.80	0.09	0.38	0.80
	Bio03	0.73*	0.26	0.59	[removida ]			[removida ]			[removida ]		
	Bio06	0.26	0.23	0.46	1.50**	0.41	0.83	-0.56	0.42	0.83	0.56	0.42	0.83
	Bio12	[removida ]			-1.10*	0.40	0.83	-0.15	0.41	0.83	0.15	0.41	0.83
	Bio15	0.92**	0.26	0.58	-0.54	0.29	0.68	0.58	0.30	0.68	-0.58	0.30	0.68
<b>Regressão</b>	R múltiplo	0.66			0.67			0.65			0.65		
	R <sup>2</sup>	0.43			0.45			0.42			0.42		
	R <sup>2</sup> aj	0.32			0.34			0.30			0.30		
	F	3.78			4.05			3.61			3.61		
	p	0.019*			0.014*			0.023*			0.023*		
	SE da estimativa	2.36			5.85			4.74			4.74		
		<b>CFT</b>			<b>CT</b>			<b><math>\delta^{13}\text{C}</math></b>					
		$\beta$	$\beta$ SE	R <sup>2</sup>	$\beta$	$\beta$ SE	R <sup>2</sup>	$\beta$	$\beta$ SE	R <sup>2</sup>			
<b>Preditores</b>	Bio01	-1.06*	0.41	0.87	-1.08*	0.41	0.87	0.42*	0.19	0.00			
	Bio03	0.33	0.24	0.60	0.35	0.23	0.60	[removida ]					
	Bio06	1.40**	0.37	0.84	1.39**	0.37	0.84	[removida ]					
	Bio12	-1.30**	0.36	0.83	-1.29**	0.36	0.83	[removida ]					
	Bio15	-1.10**	0.29	0.73	-1.09**	0.28	0.73	[removida ]					
<b>Regressão</b>	R múltiplo	0.76			0.76			0.42					
	R <sup>2</sup>	0.57			0.58			0.18					
	R <sup>2</sup> aj	0.46			0.47			0.14					
	F	5.13			5.22			4.98					
	p	0.004**			0.004**			0.036*					
	SE da estimativa	8.67			8.25			0.94					

As equações dos modelos de regressão para as respostas acima identificadas são apresentadas na Tabela 4.14. A resolução gráfica das mesmas (*scatterplots*) observou a projeção da resposta apenas em função da variável explicativa com maior contribuição para o modelo ( $|\beta|$  mais elevado,  $\text{comp} < 0.05$ ), considerando para a resolução das equações os valores médios das restantes variáveis explicativas conforme apresentado na Tabela 3.2 dos Materiais e Métodos (para QR: *Bio1*=16.32; *Bio3*=44.31; *Bio7*=25.78; *Bio13*=95.45; *Bio14*=3.83; *IA*=0.50; para QS: *Bio01*=16.19; *Bio03*=44.15; *Bio06*=3.18; *Bio12*=639.40; *Bio15*=60.66).

**Tabela 4.14.** Resumo das equações dos modelos de regressão linear múltipla significativos obtidos para as respostas de bolota de *Q. rotundifolia* e de *Q. suber*.

Espécie	Equação	
QR	Glu=97.73-4.42*Bio01-0.95*Bio07+0.25*Bio13+2.77*Bio14-55.90*IA	equação 4.1
	Fru=244.66-8.77*Bio1-0.73*Bio03-1.32*Bio07-47.64*IA	equação 4.2
	Amido=94.46-31.78*IA	equação 4.3
	ASol=351.45-11.66*Bio01-1.82*Bio03-1.82*Bio07+0.23*Bio13-54.55*IA	equação 4.4
	AInsol=-251.45+11.67*Bio01+1.82*Bio03+1.82*Bio07-0.23*Bio13+54.55*IA	equação 4.5
QS	Sac=-1.23-7.29*Bio01+1.27*Bio03+0.86*Bio06+1.03*Bio15	equação 4.6
	Amido=507.62-19.68*Bio01+12.61*Bio06-0.14*Bio12-1.52*Bio15	equação 4.7
	ASol=-5.87-1.15*Bio01-3.69*Bio06-0.02*Bio12+1.28*Bio15	equação 4.8
	AInsol=105.87+1.15*Bio01+3.69*Bio06+0.02*Bio12-1.28*Bio15	equação 4.9
	CFT=778.83-26.79*Bio01+2.40*Bio03+19.27*Bio06-0.27*Bio12-5.07*Bio15	equação 4.10
	CT=742.94-26.16*Bio01+2.40*Bio03+18.39*Bio06-0.26*Bio12-4.80*Bio15	equação 4.11
	$\delta^{13}\text{C}=-40.61+0.92*\text{Bio01}$	equação 4.12

Sac – sacarose (mg/g); Glu – glucose (mg/g); Fru – frutose (mg/g); Amido – amido (mg/g); ASol – açúcares solúveis (%); AInsol – açúcares insolúveis (%); CFT – conteúdo em fenólicos totais (mg EAG/g); CT – conteúdo em taninos (mgEAG/g);  $\delta^{13}\text{C}$  – (autoexplicativo; ‰). Bio01 – temperatura média anual (°C); Bio03 – isothermalidade; Bio06 – temperatura mínima do mês mais frio anual (°C); Bio07 – amplitude da temperatura anual (°C); Bio12 – precipitação anual (mm); Bio13 – precipitação no mês mais húmido (mm); Bio14 – precipitação no mês mais seco (mm); Bio15 – precipitação sazonal (mm); IA – índice de aridez.

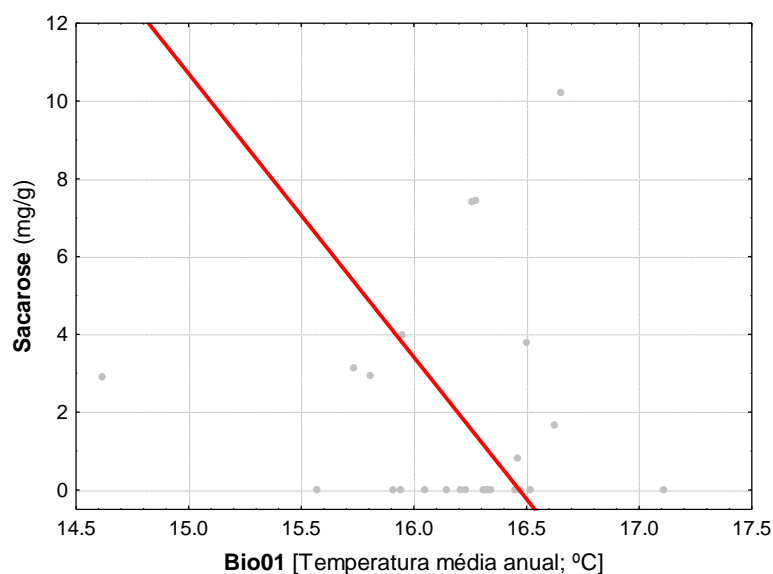
Apenas as variações químicas das bolotas de *Q. rotundifolia*, nomeadamente as relacionadas com as variações dos diferentes açúcares avaliados, foram explicadas por modelos de regressão múltipla significativos considerando os preditores anteriormente identificados (Bio01; Bio03; Bio07; Bio13; Bio14; IA). Em contraste, não só as variações dos diferentes açúcares avaliados, em *Q. suber*, foi possível a explicação das respostas fenólicas e isotópicas ligadas ao carbono ( $\delta^{13}\text{C}$ ) pelos modelos de regressão múltipla considerando os preditores selecionados (Bio01; Bio03; Bio06; Bio12; Bio15). A influência das variáveis explicativas sobre as restantes respostas a avaliadas em ambas as espécies, e cujos modelos não apresentaram significado estatístico, é apresentada no Anexo 4, Tabela A 14 a Tabela A 24.

A discussão dos modelos apresentados na Tabela 4.12 e Tabela 4.13, relativos às diferentes respostas de bolota QR e QS, respetivamente, será realizada, sempre que possível, de forma pareada.

#### 4.2.2.1 Respostas Químicas

##### Açúcares

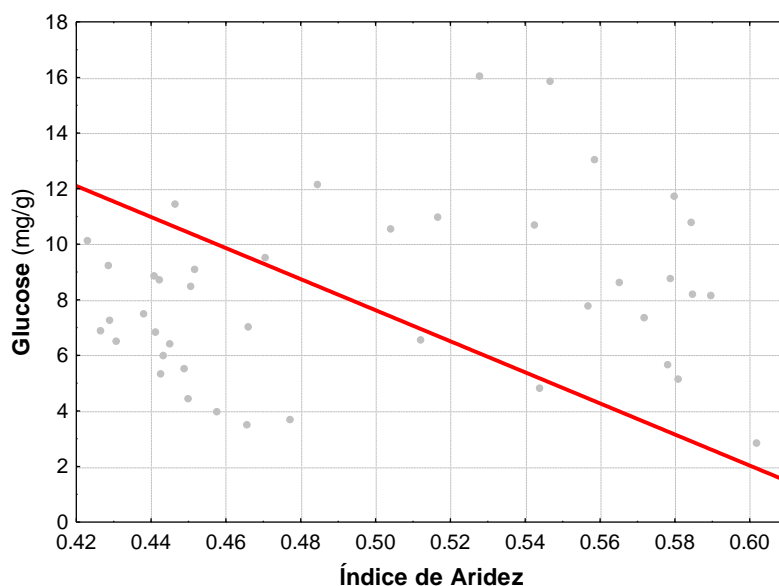
O modelo de regressão obtido para descrever a influência das variáveis bioclimáticas sobre os quantitativos de sacarose das amostras de bolota de *Q. suber*, incluiu *ca.* 43% da variância dos dados, tendo comportado todas as variáveis explicativas, com exceção da Bio12 (precipitação anual) (Tabela 4.13). Das variáveis incluídas, a variável Bio01 (temperatura média anual) foi aquela que mais contribuiu para o modelo ( $\beta=-1.19$ ), seguindo-se a Bio15 (precipitação sazonal;  $\beta=0.92$ ) e a Bio03 (isothermalidade;  $\beta=0.73$ ) e, de forma não significativa, a Bio06 (temperatura mínima do mês mais frio;  $\beta=0.26$ ). A solução gráfica deste modelo é apresentada na Figura 4.13, onde se considerou para a resolução da equação definida pela regressão múltipla (Tabela 4.14) o preditor Bio01, temperatura média anual, como variável independente, mantendo os restantes preditores como constantes tomando os respetivos valores médios.



**Figura 4.13.** Projeção do modelo de regressão múltipla da variação dos conteúdos em sacarose de *Quercus suber*.  
 $SacQs = -1.23 + (-7.29 * Bio01) + (1.27 * 44.15) + (0.86 * 3.18) + (1.03 * 60.66)$ .

De acordo com a projeção do modelo (Figura 4.13), é possível verificar que o efeito da temperatura média anual (Bio01) sobre os teores de sacarose da bolota de *Q. suber* tem um impacto negativo sobre esta resposta, *i.e.*, temperaturas anuais superiores implicam uma diminuição dos teores deste dissacárido. Tomando em conta o importante contributo da precipitação sazonal para as variações da sacarose de bolota QS, cujo efeito é contrário ao descrito, e as previsões das alterações climáticas (aumento da temperatura média e menor quantidade de precipitação), a tendência descrita pelo modelo aparenta integrar as tendências globais, com consequências importantes, de diminuição, de sacarose nas bolotas de *Q. suber*. Assim, considera-se que as relações ambientais estabelecidas pelos gradientes de temperatura e precipitação sazonal dos locais de amostragem impactam a aquisição de nutrientes energéticos. Para fins alimentares, o comportamento descrito implica a seleção de bolota de *Q. suber* de locais com condições climáticas que garantam a doçura da bolota, *i.e.*, locais menos áridos como aqueles verificados no Montado com maior influência Atlântica ou os localizados mais a Norte do Alentejo. Nestes locais, as condições de temperatura e precipitação anuais são compatíveis com a maximização dos teores de sacarose da bolota de *Q. suber*.

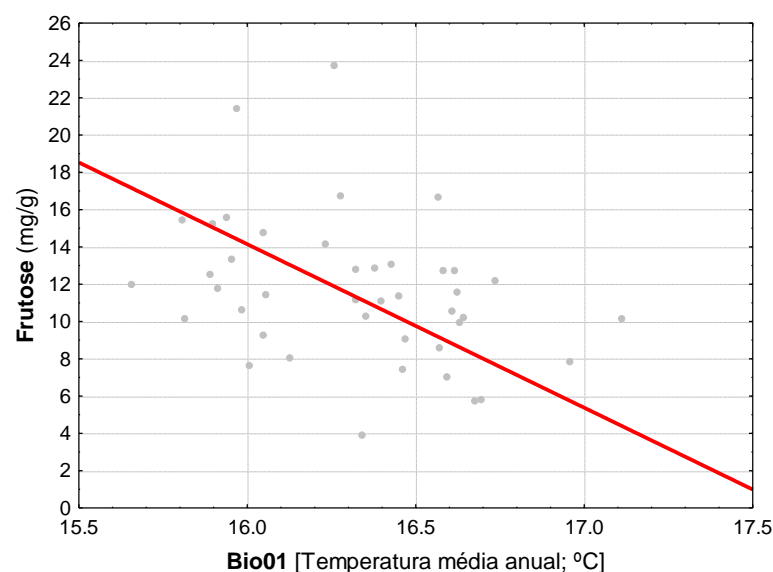
O modelo de regressão obtido para a avaliação do efeito dos preditores identificados sobre o teor de glucose das amostras de bolota de *Q. rotundifolia* resultou numa explicação de 30% da variância contida nos dados (Tabela 4.12). Para os teores de glucose da bolota QR, o índice de aridez (IA,  $\beta = -1.1$ ) foi a variável explicativa com maior peso para a descrição das variações desta resposta no gradiente climático avaliado, seguindo-se a precipitação no mês mais seco (Bio14;  $\beta = 0.69$ ), a precipitação no mês mais húmido (Bio13;  $\beta = 0.56$ ) e a temperatura média anual (Bio01;  $\beta = -0.49$ ). Embora a amplitude da temperatura anual (Bio07;  $\beta = -0.36$ ) tenha sido incluída no modelo de regressão múltipla, o seu efeito apresenta-se como não significativo para as variações de glucose. A projeção dos teores de glucose das amostras de bolota *Q. rotundifolia* sobre a influência do índice de aridez é apresentada na Figura 4.14.



**Figura 4.14.** Projeção do modelo de regressão múltipla da variação dos conteúdos em glucose de *Quercus rotundifolia*.  
 $Glu_{QR} = 97.73 + (-4.42 \cdot 16.32) + (-0.95 \cdot 25.78) + (0.25 \cdot 95.45) + (2.77 \cdot 3.83) + (-55.90 \cdot IA)$ .

A resolução da equação do modelo de regressão da glucose em função do índice de aridez (e mantendo os restantes preditores constantes; valor médio registado no respetivo gradiente de variação), revela uma correlação negativa entre o teor de glucose e o índice de aridez. Este comportamento descreve a diminuição dos teores de glucose com o aumento do índice de aridez, isto é, à medida que a aridez do local de amostragem aumenta (menores valores de índice de aridez), maior será o teor em glucose. Em termos alimentares, a perceção da doçura da bolota de *Q. rotundifolia* poderá assim ser superior em locais de maior aridez, justificando a exploração deste fruto em fresco com base nesta característica em locais que reúnam estas condições, particularmente o interior do Alentejo.

A variável explicativa com maior peso na justificação das variações dos teores de frutose das amostras de bolota de *Q. rotundifolia* no contexto climático avaliado, foi a temperatura média anual (Bio01;  $\beta = -0.77$ ) e cujo peso é semelhante ao imputado pelo índice de aridez (IA;  $\beta = -0.75$ ). Para o modelo desta resposta (Tabela 4.12), contribuem ainda os preditores isotermalidade (Bio03;  $\beta = -0.21$ ), amplitude da temperatura anual (Bio07;  $\beta = -0.39$ ). A resolução da equação do modelo, explicando 34% da variância, foi alcançada conforme descrito anteriormente para a projeção da resposta em função da Bio01 e apresenta-se na Figura 4.15.



**Figura 4.15.** Projeção do modelo de regressão múltipla da variação dos conteúdos em frutose de *Quercus rotundifolia*.  

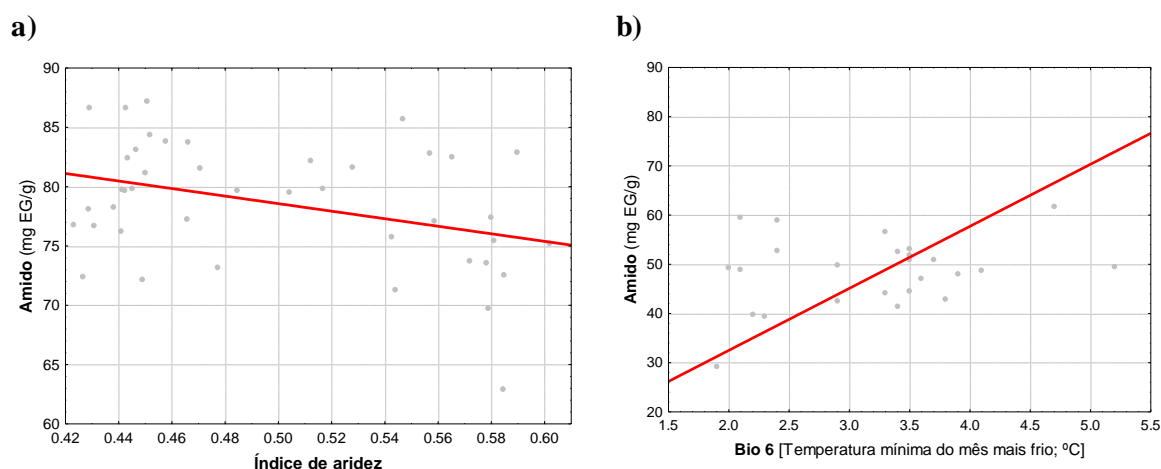
$$\text{Fru}_{\text{QR}} = 244.66 + (-8.77 \cdot \text{Bio01}) + (-0.73 \cdot 44.31) + (-1.32 \cdot 25.78) + (-47.64 \cdot 0.5).$$

Da projeção apresentada na Figura 4.15, verifica-se que em resposta ao aumento da temperatura média anual (Bio01), os teores de frutose na bolota de *Q. rotundifolia* apresentam uma tendência para diminuir. De forma idêntica, e pela semelhança entre os contributos da Bio01 e IA sobre o modelo da frutose, os menores valores de IA implicam teores de frutose superiores, isto é, os teores de frutose das bolotas de *Q. rotundifolia* de locais mais áridos serão superiores aos verificados nas bolotas QR de locais mais húmidos. A relação inversa encontrada entre os teores de glucose e frutose, num mesmo contexto climático, poderá ser indicativa de variações significativas das relações entre estes monossacáridos associadas ao aumento do stress hídrico. Estas respostas apontam assim para um aumento generalizado da doçura da bolota de *Q. rotundifolia* em locais de maior aridez, sendo este comportamento suportado pelas conclusões de Abreu *et al.* (2019) que verificaram uma maior aceitabilidade no consumo de bolota em fresco de zonas como Moura (interior do Alentejo, mais árido) face a Montemor-o-Novo (menos árido), pela maior perceção de doçura. Justifica-se, portanto, a exploração da bolota de *Q. rotundifolia* de zonas classificadas como semi-áridas para o consumo alimentar em fresco.

Para o amido das amostras de bolota de *Q. rotundifolia*, a única variável explicativa das respetivas variações incluídas no modelo de regressão foi o índice de aridez (IA;  $\beta = -0.37$ ), explicando apenas 14% da variância dos dados (Tabela 4.12). No caso das bolotas de *Q. suber*, as variações de amido resultam das interações entre os preditores temperatura média anual (Bio01), temperatura mínima do mês mais frio (Bio06), precipitação anual (Bio12) e precipitação sazonal (Bio15) (Tabela 4.13), explicando 45% da variância dos dados. Neste modelo, o preditor que mais contribui para as variações dos teores de amido é a temperatura mínima do mês mais frio (Bio06;  $\beta = 1.50$ ), seguindo os contributos da temperatura média anual (Bio01;  $\beta = -1.28$ ), precipitação anual (Bio12;  $\beta = -1.10$ ) e, sem significado estatístico, a precipitação sazonal (Bio15;  $\beta = -0.54$ ).

De acordo com a resolução da equação do modelo dos teores de amido da bolota *Q. rotundifolia* e a respetiva projeção (Figura 4.16a), constata-se a diminuição dos teores de amido com o aumento do índice de aridez. Esta tendência demonstra que os locais mais áridos (menor IA) apresentam teores de amido superiores, podendo o mesmo estar associado com a incorporação de nutrientes como estratégia de sobrevivência às condições de maior stress hídrico. Na Figura 4.16b, onde se apresenta a resolução do modelo dos teores de amido da bolota *Q. suber*, verifica-se que o aumento da temperatura mínima

do mês mais frio implica o aumento de amido das bolotas, possivelmente explicando também uma estratégia de sobrevivência.



**Figura 4.16** Projeção do modelo de regressão múltipla da variação dos conteúdos em amido de *Quercus rotundifolia* (a) e de *Quercus suber* (b).

$$\text{Amido}_{QR} = 94.46 + (-31.78 \cdot \text{IA});$$

$$\text{Amido}_{QS} = 507.62 + (-19.68 \cdot 16.19) + (12.61 \cdot \text{Bio06}) + (-0.14 \cdot 639.4) + (-1.52 \cdot 60.66).$$

A partir dos modelos gerados para descrever as variações de amido, é possível concluir que diferentes preditores impactam esta resposta na dependência da espécie. No entanto, ambas as espécies parecem responder de forma idêntica. De facto, os teores de amido da bolota de *Q. rotundifolia* aparentam ser mais sensíveis a variações de aridez, enquanto os teores das bolotas de *Q. suber* apresentam maior sensibilidade às variações de temperatura e de precipitação (com sentido contrário ao verificado para Bio06). Considerando que o aumento na aridez de um local implica temperatura mais elevada e menor precipitação, ambas as espécies apresentam a tendência de aumentar os respetivos teores de amido. A tendência das plantas em acumular maiores quantidades de compostos de reserva nas suas sementes é sugerida por Metz *et al.* (2010), que concluiu que sementes com maiores dimensões refletem uma estratégia de adaptação para gerir condições ambientais desfavoráveis. Esta estratégia pode ser indicativa de que o sucesso das sementes maiores se relaciona com a (maior) quantidade de reservas metabólicas acumuladas nestas sementes.

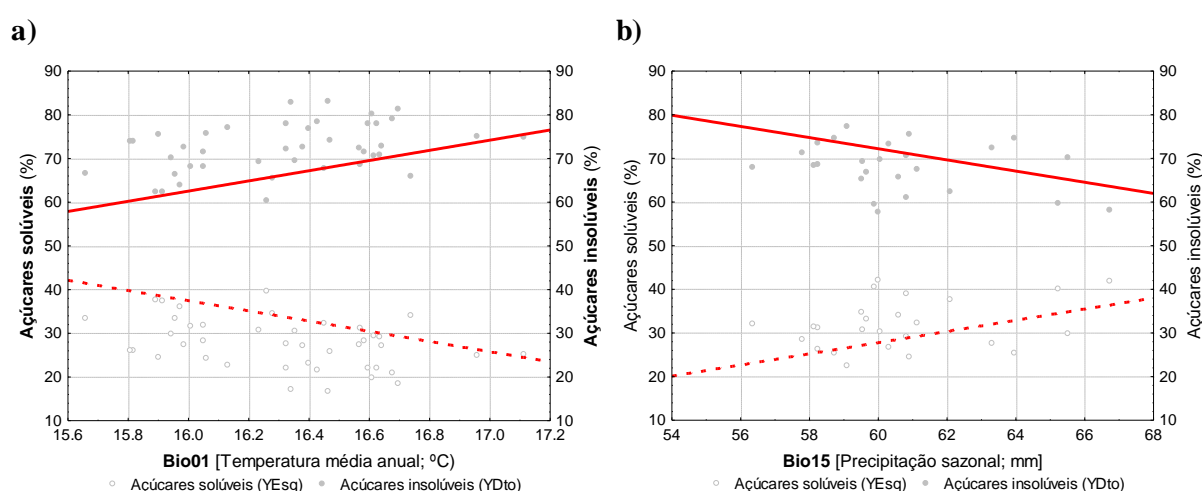
Para o processamento tecnológico da bolota, os comportamentos descritos para as variações de amido das duas espécies sugerem que as bolotas provenientes de locais com maior aridez (menor IA) terão possivelmente vantagens na sua transformação em farinhas, considerando o rendimento em amido. Ressalva-se, no entanto, que deverão ser conduzidos estudos sobre o comportamento reológico das farinhase das propriedades do amido obtidos, para verificação da aptidão tecnológica, que poderá diferir entre espécies.

As variações percentuais dos açúcares solúveis e insolúveis das amostras de bolota *Q. rotundifolia* foram influenciadas pelas mesmas variáveis explicativas ( $R^2=0.38$ ), embora em sentidos opostos, sendo os solúveis maioritariamente influenciados de forma negativa e os insolúveis de forma positiva (cf. Tabela 4.12). A variável com maior peso foi a temperatura média anual (Bio01;  $|\beta|=0.70$ ), seguindo-se o índice de aridez (IA;  $|\beta|=0.58$ ). A única variável excluída do modelo de regressão foi a Bio14 (precipitação no mês mais seco), apresentando os restantes preditores menores contributos e diferentes significâncias para as variações verificadas nestas respostas. À semelhança, as variações em açúcares solúveis e insolúveis da bolota de *Q. suber* foram influenciados pelos mesmos preditores em sentidos opostos, explicando 42% da variância contida nos dados (cf. Tabela 4.13). Todavia, os preditores diferem de *Q. rotundifolia*, e os respetivos contributos não apresentam significado estatístico.



O modelo inclui todos os preditores, com exceção da isothermalidade (Bio03). Entre os preditores incluídos, a precipitação sazonal (Bio15;  $|\beta|=0.58$ ) foi a que mais contribuiu para o modelo gerado.

De acordo com a resolução das equações dos modelos de açúcares solúveis e insolúveis de bolota de *Q. rotundifolia* em função da Bio01 (temperatura média anual; Figura 4.17a), é possível verificar uma tendência de diminuição das variações percentuais em açúcares solúveis e de incremento em açúcares insolúveis com o aumento da temperatura média anual (Bio01). Estas tendências são concordantes com as variações dos teores de glucose, frutose e de amido verificados em bolota de *Q. rotundifolia* no mesmo contexto climático, indicando que o aumento de temperatura/aridez influencia de forma significativa as relações entre açúcares simples (mono e dissacáridos) e complexos (polissacáridos). Estas relações indicam maiores investimentos da planta nas suas sementes como estratégia de adaptação à escassez de água, aumentando a probabilidade de sobrevivência/germinação. Como referido, Metz *et al.* (2010) descrevem que sementes de maiores dimensões, com mais compostos de reserva, apresentam taxas de sobrevivência superiores às sementes de menor dimensão.



**Figura 4.17.** Projeção do modelo de regressão múltipla da variação dos conteúdos em açúcares solúveis (%) e de açúcares insolúveis (%) de *Quercus rotundifolia* (a) e de *Quercus suber* (b).

$$ASol_{QR} = 351.45 + (-11.66 \cdot Bio01) + (-1.82 \cdot 44.31) + (-1.82 \cdot 25.78) + (0.23 \cdot 95.45) + (-54.55 \cdot 0.4);$$

$$AInsol_{QR} = 251.45 + (11.66 \cdot x) + (1.82 \cdot 44.31) + (1.82 \cdot 25.78) + (-0.23 \cdot 95.45) + (54.55 \cdot 0.4);$$

$$ASol_{QS} = -5.87 + (-1.15 \cdot 16.19) + (-3.69 \cdot 3.18) + (-0.02 \cdot 639.40) + (1.28 \cdot Bio15);$$

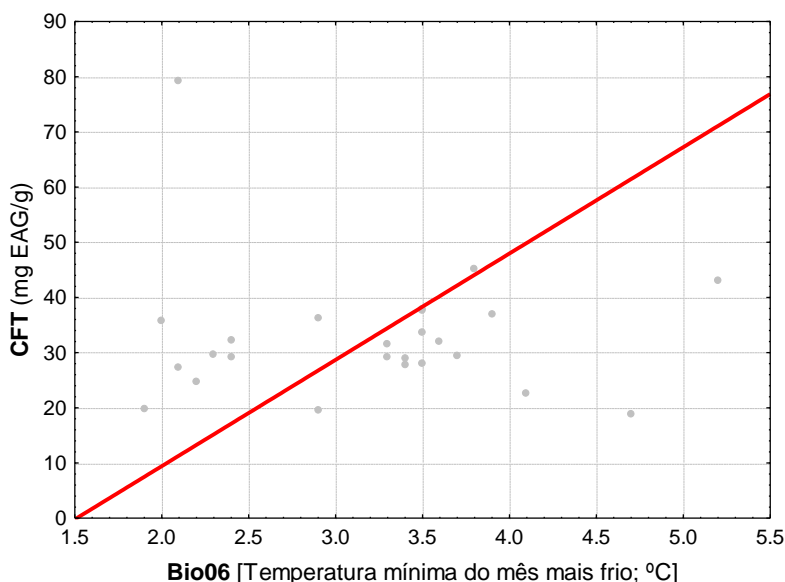
$$AInsol_{QS} = 105.87 + (1.15 \cdot 16.19) + (3.69 \cdot 3.18) + (0.02 \cdot 639.40) + (-1.28 \cdot Bio15).$$

O comportamento dos açúcares solúveis e insolúveis de bolota de *Q. suber* (Figura 4.17b), aumento/diminuição dos solúveis/insolúveis com o aumento da precipitação sazonal, é concordante com os modelos dos teores de sacarose e de amido, indicando que bolotas de *Q. suber* de locais com menor variabilidade de precipitação (mais áridos, por norma) apresentam menores/maiores quantitativos em açúcares solúveis/insolúveis. Este comportamento, como referido anteriormente, pode representar uma estratégia de adaptação de *Q. suber*, onde a planta investe mais nas suas sementes para aumentar a probabilidade de sobrevivência em locais onde é verificado maior stress hídrico. Esta possível estratégia adaptativa poderá ser assim vista como uma vantagem para o consumo alimentar, considerando a principal via de aproveitamento da bolota (produção de farinha).

### Compostos Fenólicos

Como mencionado anteriormente, foram alcançados modelos das respostas fenólicas da bolota apenas para *Q. suber*. Os modelos gerados para as respostas conteúdo fenólico total (CFT;  $R^2=0.57$ ) e conteúdo em taninos (CT;  $R^2=0.58$ ), foram obtidos a partir dos todos os preditores, com contributos importantes e semelhantes para os modelos (cf. Tabela 4.13).

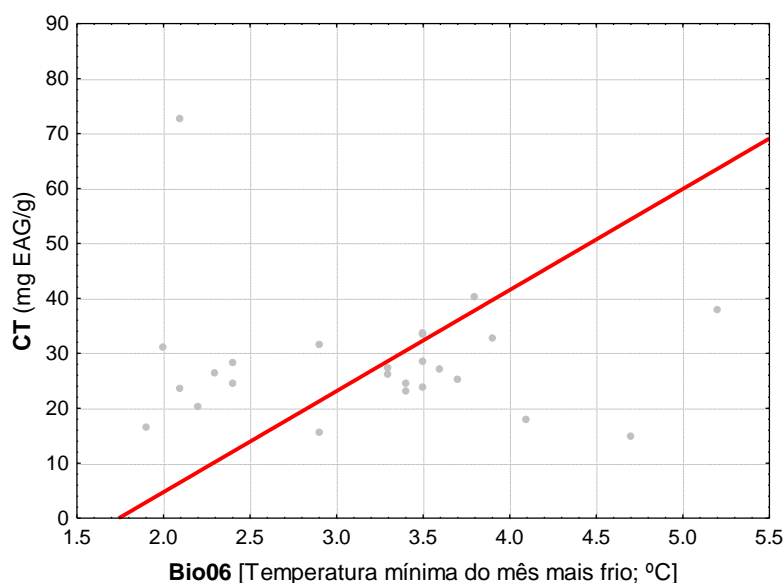
Para o modelo que descreve a resposta CFT das bolotas de *Q. suber* o peso da contribuição de 4 dos 5 preditores (temperatura mínima do mês mais frio, Bio06; precipitação anual, Bio12; precipitação sazonal, Bio15; temperatura média anual, Bio01) foi elevada ( $|\beta| \geq 1$ ) e significativa, onde a isothermalidade (Bio03), com menor contribuição ( $\beta=0.33$ ), não apresentou significado estatístico. Para a resolução gráfica, optou-se pela projeção dos CFT da bolota QS em função da temperatura mínima do mês mais frio (Bio06), como se apresenta na Figura 4.18.



**Figura 4.18.** Projeção do modelo de regressão múltipla da variação do conteúdo fenólico total de *Quercus suber*.  
 $CFT_{QS} = 778.83 + (-26.79 \cdot 16.19) + (2.40 \cdot 44.15) + (19.27 \cdot Bio06) + (-0.27 \cdot 639.40) + (-5.07 \cdot 60.66)$ .

De acordo com o observado na Figura 4.18, a projeção do modelo de CFT em bolota *Q. suber* sugere uma tendência de aumento do CFT da bolota com o aumento da temperatura mínima do mês mais frio. Esta tendência poderá resultar de processos de aclimação da espécie, considerando que os compostos fenólicos são associados a mecanismos de defesa contra diferentes tipos de stress, incluindo a variação de temperatura. Considerando uma estratégia de valorização global da bolota, os locais amostrados com temperatura mínima do mês mais frio mais elevada podem apresentar uma vantagem para a exploração da bolota como fonte de extração de compostos bioativos de interesse, como os fenólicos, atendendo aos elevados quantitativos observados.

Para a resposta conteúdo em taninos das bolotas de *Q. suber*, tal como para o CFT, o peso das contribuições dos 4 dos 5 preditores (temperatura mínima do mês mais frio, Bio06; precipitação anual, Bio12; precipitação sazonal, Bio15; temperatura média anual, Bio01) foi elevado ( $|\beta| \geq 1$ ) e significativo (cf. Tabela 4.13). De forma semelhante, a isothermalidade (Bio03) não apresentou significado estatístico e teve um menor aporte para o modelo ( $\beta=0.35$ ). A projeção do modelo (Figura 4.19) foi realizada considerando CT da bolota QS em função da temperatura mínima do mês mais frio (Bio06).

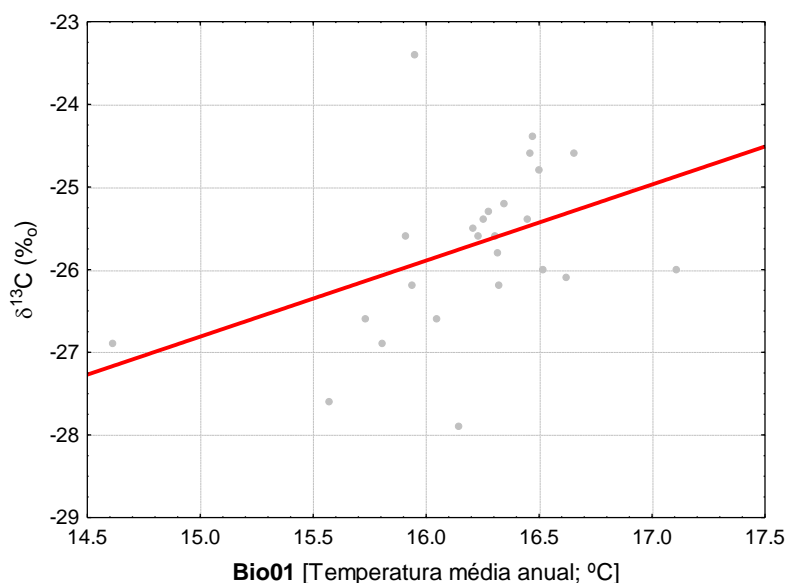


**Figura 4.19.** Projeção do modelo de regressão múltipla da variação do conteúdo tanino de *Quercus suber*.  
 $CT_{QS} = 742.94 + (-26.16 * 16.19) + (2.40 * 44.15) + (18.39 * Bio6) + (-0.26 * 639.40) + (-4.80 * 60.66)$ .

O comportamento observado (Figura 4.19), com aumento do CT da bolota de *Q. suber* com o aumento da temperatura mínima do mês mais frio, sugere que os locais onde se verifica a condição temperatura mínima mais elevada, a bolota QS apresentará teores de CT mais elevados, imprimindo maior adstringência e menor valor nutritivo pela redução da digestibilidade das proteínas (Duodu *et al.*, 2003). Em termos de valorização alimentar, esta tendência deverá ser tida em conta, uma vez que implicará pré-tratamentos para a minimização dos taninos para posterior consumo ou processamento, mas poderá apresentar aptidão de valorização por outras indústrias, para a extração destes compostos com potenciais aplicações como antimicrobianos e antifúngicos (Zhu *et al.*, 2019) ou curtimento de peles.

#### 4.2.2.2 Respostas Isotópicas

Também nas bolotas de *Q. suber* foi possível modelar a resposta isotópica  $\delta^{13}C$ , verificando-se um modelo reduzido com um único preditor: temperatura média anual (Bio01;  $\beta=0.42$ ). O modelo explica de forma significativa apenas 18% da variância contida nos dados (cf. Tabela 4.13), mas indica um enriquecimento em  $^{13}C$  com o aumento da temperatura anual dos locais amostrados, conforme se verifica na projeção do modelo apresentado na Figura 4.20. O enriquecimento em  $^{13}C$  pode então ser relacionado com ajustes funcionais diferenciais do carbono, em resposta ao contexto climático, particularmente às fontes de água disponíveis (Damesin *et al.*, 1997).



**Figura 4.20.** Projeção do modelo de regressão múltipla da variação do conteúdo em isótopos estáveis de carbono de *Quercus suber*.  
 $\delta^{13}C_{QS} = -40.61 + (0.92 \cdot x)$ .

A variação de  $\delta^{13}C$  pode ser considerada como indicador das diferenças na disponibilidade de água, quantidade de precipitação, temperatura e humidade atmosférica relativa entre locais geograficamente distintos. Normalmente, valores menos negativos de  $\delta^{13}C$  são encontrados em áreas mais áridas devido ao aumento da seca e escassez de recursos hídricos, uma consequência do controlo estomático em condições de seca. Em plantas C3, como no caso dos *Quercus*, foi demonstrado que  $\delta^{13}C$  diminui com a diminuição do stress hídrico (Ferrio *et al.*, 2007), situação associada com temperatura mais baixa no contexto geográfico e climático avaliado. Assim, é previsível que em áreas mais áridas (com o aumento da seca e escassez de recursos hídricos), que determinam o fecho estomático e limitam a difusão de  $CO_2$  no interior das folhas, aumentaria (ou seja, torna menos negativo) o  $\delta^{13}C$  da planta, conforme sugerido pelo modelo obtido.

Além disso, há também a necessidade de se considerar a composição química das bolotas, o que pode influenciar os valores de  $\delta^{13}C$ . Os principais componentes das sementes, as proteínas e os hidratos de carbono, normalmente têm valores mais elevados (menos negativos) de  $\delta^{13}C$ , enquanto os valores de  $\delta^{13}C$  dos lípidos são mais baixos (mais negativos) (Ghashghaie *et al.*, 2001; Kennedy *et al.*, 2004). Portanto, os dados deste trabalho sugerem que os recursos armazenados em bolotas de locais com uma temperatura média anual mais elevada são principalmente hidratos de carbono. Assim, o modelo encontrado para a resposta  $\delta^{13}C$  de bolota QS é concordante com o modelo do amido e açúcares (in)solúveis, que sugerem conteúdos mais elevados de hidratos de carbono em bolotas de *Q. suber* provenientes de locais mais áridos.

## 5 Conclusões

A abundância de bolota da floresta Mediterrânica e a respetiva composição bioativa e nutricional suportam a promoção da sustentabilidade do Montado pela incorporação do uso deste recurso, através da inovação de alimentos à base de bolota. A bolota pode ser aproveitada, não só como alimento de *per si*, como também ser considerada no âmbito do conceito de Economia Circular, prevendo-se uma estratégia de valorização global. Acrescenta-se ainda que as bolotas podem ser tidas como indicadores do "status" do ecossistema em que se inserem: o investimento das plantas em frutos/sementes pode ser influenciado pela respetiva adaptação ao stress hídrico e variáveis ambientais.

Confirmou-se uma elevada variabilidade nas diferentes características da bolota por espécie e entre espécies de *Quercus*. Esta variabilidade pode encontrar justificação na plasticidade das respostas das espécies às condições ambientais do ecossistema, contribuindo para a resiliência do mesmo. Apesar da variabilidade registada, o presente estudo permite retirar algumas conclusões que contribuem para uma melhor perceção da potencialidade da bolota do sistema EVN Montado.

De acordo com as características morfológicas da bolota, foi possível distinguir as espécies de *Quercus* dominantes no Montado Alentejano, constatando-se que as bolotas de *Q. rotundifolia* apresentam maiores dimensões que as de *Q. suber*. A proveniência (origem geográfica) foi igualmente um fator influente na distinção das bolotas dentro e entre as espécies, onde as condições ambientais determinaram o aumento do comprimento das bolotas em locais mais áridos. Em concordância, as características morfológicas das bolotas são reveladoras da incorporação de fatores ambientais locais, suportando a avaliação das mesmas como ferramenta indicadora de estratégias adaptativas destas espécies do Montado. Além disso, é possível inferir que, na ótica alimentar, as bolotas de *Q. rotundifolia*, pelo maior tamanho, apresentam vantagem em termos do rendimento das operações de transformação tecnológica (e.g. rendimento em farinha).

Das características químicas da bolota, apenas as diferenças nos quantitativos dos açúcares permitem distinguir as espécies e a origem geográfica das mesmas. Entre espécies destacam-se particularmente os quantitativos em sacarose, glucose e amido, sendo o amido (açúcar insolúvel) o hidrato de carbono mais representativo em ambas as espécies ( $\approx 70\%$ ). As bolotas de *Q. rotundifolia* apresentam teores de sacarose e amido 10 e 1.6 vezes superiores aos de *Q. suber*, respetivamente, enquanto teores superiores de glucose são determinados em *Q. suber* (9.02 vs. 7.57 mg/g). Estas relações determinam assim diferenças entre as bolotas, constatando-se que as de *Q. rotundifolia* apresentam um maior teor em açúcares totais, de 1.4 vezes superior face a *Q. suber*. A diferença entre os quantitativos em sacarose, entre espécies, suporta igualmente a perceção de maior doçura associada às bolotas de *Q. rotundifolia*, fator com bastante preponderância para a avaliação da aptidão para processamento alimentar.

Apesar das limitações dos modelos de regressão múltipla gerados na verificação da influência das condições climáticas e ambientais sobre a componente dos açúcares das bolotas de ambas as espécies, destaca-se que as variações nos teores de amido das bolotas *Q. rotundifolia* e *Q. suber* respondem às variações de temperatura e de índice de aridez. A incorporação destas variáveis de longo termo é determinada pelo aumento do conteúdo em amido das bolotas em resposta ao aumento da aridez, independentemente da espécie. Esta tendência pode ser relacionada com as estratégias de adaptação das espécies às condições ambientais do ecossistema, indicando um maior investimento das plantas nas suas sementes em condições de maior stress hídrico. Estas tendências são igualmente reveladoras de que no aproveitamento alimentar da bolota, nomeadamente na obtenção de farinhas, as bolotas de *Q. rotundifolia* apresentam uma aptidão tecnológica superior às bolotas de *Q. suber*. Considerando o rendimento em amido, de grande relevância para a obtenção de farinhas e potencial extração como ingrediente alimentar (agente espessante), bolotas provenientes de locais mais áridos serão mais

atrativas, não obstante, identifica-se a necessidade de avaliação das propriedades do amido, que poderá diferir tanto entre espécies como entre origens geográficas.

Embora os teores expressivos em compostos fenólicos (>30 mg EAG/g), dos quais 85% são quantificados como taninos, suportem a exploração da bolota como matriz de extração de compostos com elevada bioatividade (*e.g.*, atividade antioxidante, antimicrobiana e antifúngica), a distinção entre espécies baseada nesta característica não foi possível. A distinção entre as diferentes origens da bolota apenas é marginalmente atingida, verificando-se ligeiros aumentos (ca 10%) na dependência do aumento da aridez, situação que poderá estar relacionada com a associação destes compostos ao mecanismo de defesa contra stresses (a)bióticos da planta. A diferença encontrada entre espécies no que respeita aos teores proteicos, superior em bolotas de *Q. suber*, contribuem igualmente para a maior adstringência percebida nas bolotas desta espécie face às de *Q. rotundifolia*, pela limitação dos taninos na digestibilidade das proteínas e consequente diminuição do valor nutritivo associado.

Na avaliação da composição elementar e isotópica das bolotas é possível concluir que as bolotas poderão ser utilizadas como ferramenta para a distinção entre espécies e contexto climático. Os maiores teores de azoto nas bolotas de *Q. suber* sugerem que os solos apresentam maiores disponibilidades em azoto e água face àqueles onde *Q. rotundifolia* prospera. As diferenças encontradas no rácio C/N das bolotas, superior nas de *Q. rotundifolia*, além da indicação da eficiência do uso de azoto, é indicativo de um teor lipídico também superior nas bolotas desta espécie.

O enriquecimento em  $^{15}\text{N}$  nas bolotas de “*Q. rotundifolia* x Semi-árido” face às “*Q. suber* x Seco sub-húmido” é uma clara resposta ao contexto edafo-climático dos locais, demonstrando a integração da variação climática de longo termo e a disponibilidade de nutrientes no solo. Além disso, nas bolotas de *Q. suber* foi possível verificar um enriquecimento em  $^{13}\text{C}$  consequente do aumento da temperatura anual dos locais amostrados, indicativo de ajustes no padrão de aquisição do carbono no contexto climático associado ao stress hídrico. Acresce ainda que os valores menos negativos de  $\delta^{13}\text{C}$  das bolotas de *Q. suber* encontrados nos locais mais áridos sugerem uma composição química mais rica em hidratos de carbono, confirmando as relações encontradas entre açúcares solúveis, amido, e o aumento de aridez.

Perante o exposto, a variabilidade das características morfológicas, químicas e isotópicas das bolotas das espécies de *Quercus* do Montado, quando integrada no contexto climático e ambiental associado à origem geográfica, permite uma seleção de locais de colheita de bolota, atendendo à estratégia de valorização pretendida. Assim, bolotas de *Q. rotundifolia* de locais mais áridos apresentam maiores potencialidades para o processamento alimentar, pela potenciação dos teores de amido e açúcares solúveis, enquanto as bolotas de *Q. suber* apresentam maior potencialidade para a extração de compostos bioativos (fenólicos), particularmente aquelas colhidas em locais mais áridos. Por outro lado, os resultados obtidos assistem à utilização das bolotas como ferramenta para avaliar alterações climáticas e estratégias de adaptação do ecossistema ao stress hídrico.

Por último, refere-se que a avaliação do efeito do processamento (secagem/moagem) da bolota em farinha, objetivo comprometido pela atual situação pandémica, deverá ser realizada para aferir o respetivo impacto na qualidade nutricional e funcional da bolota como matéria-prima/ingrediente nutritivo saudável, assim como a definição de potenciais rotas de valorização dos co-produtos de processamento de bolota em farinha, as cascas.

## 6 Referências Bibliográficas

- Abdala-Roberts, L., Gálman, A., Petry, W. K., Covelo, F., de la Fuente, M., Glauser, G., Moreira, X. (2018). *Interspecific variation in leaf functional and defensive traits in oak species and its underlying climatic drivers*. PLoS ONE 13(8): e0202548. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202548>
- Abidi, S. L. (2001). *Chromatographic Analysis of Plant Sterols in Foods and Vegetable Oils*. Journal of Chromatography A, 935:173–201.
- Abreu, M. I., Silva, A. B., Serrano, H. C. (2019). *Soluble Sugars from Acorns of Quercus Ilex subsp. rotundifolia Increase with Aridity*. In Book of Abstracts of the 15th European Ecological Federation Congress “Ecology across borders: Embedding Ecology in Sustainable Development Goals”, pp.231.
- Afzal-Raffi, Z., Dodd, R. S., Pelleau, Y. (1992). *Mediterranean evergreen oak diversity: morphological and chemical variation of acorns*. Canadian Journal of Botany, volume 70, 7:1459–66.
- Aguilera, J. F., Nieto, R., Rivera, M., Garcia, M. A. (2002). *Amino acid availability and energy value of acorn in the Iberian pig*. Livestock Production Science, 77:227–39.
- Aguilera, M., Ferrio, J. P., Araus, J. L., Tarrús, J., Voltas, J. (2011). *Climate at the onset of western Mediterranean agriculture expansion: Evidence from stable isotopes of sub-fossil oak rings in Spain*. Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol, 299: 541–551. Doi:10.1016/j.palaeo.2010.11.026.
- Aizen, M. A., Woodcock, H. (1996). *Effects of acorn size on seedling survival and growth in Quercus rubra following simulated spring freeze*. Canadian Journal of Botany, 74:308–14.
- Alegria, C. (2018). *Adding value to “Montado” acorn production – Innovation and tradition for a sustainable growth*. Apresentação Power-Point. Encontros Scientia, 24 de Maio, 2018, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Portugal. [URL: <http://ce3c.ciencias.ulisboa.pt/outreach/scientia/ver.php?id=72>].
- Alegria, C., Antunes, C., Giovanetti, M., Abreu, M., Máguas, C. (2020). *Acorn Isotopic Composition: A New Promising Tool for Authenticity Maps of Montado's High-Value Food Products*. Molecules, 25(7), 1535. [doi: 10.3390/molecules25071535].
- Alegria, C., Antunes, C., Oliveira, T., Costa, C., Silva, A., Clemente, A., Chozas, S., Giovanetti M., Máguas, C. (2019). *Acorns as proxies to Quercus adaptation response to increase drought under climate change*. 15th European Ecological Federation Congress “Ecology across borders: Embedding Ecology in Sustainable Development Goals”, August 2, 2019, Lisbon, Portugal. <https://congressos.leading.pt/reports/reports.aspx?ref=resumofinal1&evento=47&formulario=109&render=pagina&cod=14094&chave=00436251EF>
- Alegria, C., Gonçalves, E. M., Máguas, C., Abreu, M. (2018b). *Mathematical modelling of the drying kinetics of acorn (Quercus rotundifolia) - optimization of shelling process*. In: Book of Abstracts of the International Conference on Mediterranean Diet and Gastronomy: Linking Innovation, Sustainability and Health, October 15-16, 2018, Évora, Portugal, pp. 77.
- Alegria, C., Máguas, C., Abreu, M. (2018a). *Optimizing acorn (Quercus rotundifolia) shelling process: a first step to promote innovative acorn-based food products*. Book of Abstracts of the “5th Food Integrity Conference, Assuring the integrity of the food chain: Delivering real world solutions” (FOODINTEGRITY 2018), November 14-15, 2018, Nantes, France, pp. 185-186. (ISBN 978-2-9566303-2-6; [https://www.foodintegrity2018-nantes.eu/wp-content/uploads/2018/11/Book-of-Abstracts\\_vFinal\\_web2.pdf](https://www.foodintegrity2018-nantes.eu/wp-content/uploads/2018/11/Book-of-Abstracts_vFinal_web2.pdf)).
- Al-Rousan, W. M., Ajo, R. Y., Al-Ismail, K. M., Attlee, A., Shaker, R. R., Osaili, T. M. (2013). *Characterization of Acorn Fruit Oils Extracted from Selected Mediterranean Quercus Species*. Grasas y Aceites, 64:554-560.
- Al-Rousan, W. M., Al-Ismail, K. M., Attlee, A., Shaker, R. R., Osaili, T. M. (2013). *Characterization of acorn fruit oils extracted from selected Mediterranean Quercus species*. Grasas y Aceites 64:554–60.
- Antunes, C., Barradas, M. C. D., Zunzunegui, M., Vieira, S., Pereira, A., Anjos, A., Máguas, C. (2018). *Contrasting plant water-use responses to groundwater depth in coastal dune ecosystems*. Functional Ecology, 32(8), 1931-1943.
- Associação Portuguesa de Nutrição (2017). *Alimentar o futuro: uma reflexão sobre sustentabilidade alimentar*. E-book n.º 43. Porto: Associação Portuguesa de Nutrição.

- Bainbridge, D. A. (2001). *Acorns as food: history, use, recipes, and bibliography*. Calif., U.S.A.: Sierra Nature Prints.
- Batista T., de Mascarenhas J. M., Mendes P., (2017). *Montado's ecosystem functions and services: the case study of Alentejo Central – Portugal*. The Problems of Landscape Ecology, Vol. XLIV, 15-27 pp..
- Belkaid, A., Currie, J. C., Desgagnés, J., Annabi, B. (2006). *The chemopreventive properties of chlorogenic acid reveal a potencial new role for the microsomal glucose-6-phosphate translocase in brain tumor progression*. Cancer Cell International, 6, 7:1–7:12.
- Branco, O., Bugalho, M., Silva, L. N., Barreira, R., Vaz, P. G., & Dias, F. (2010). *Hotspot areas for biodiversity and Ecosystem Services in montados – HABEaS*. Lisbon.
- Bugalho, M. N., Caldeira, M. C., Pereira, J. S., Aronson, J., Pausas, J. G. (2011). *Mediterranean cork oak savannas require human use to sustain biodiversity and ecosystem services*. Frontiers in Ecology and the Environment, 9(5), 278-286.
- Cañellas I., Roig S., San Miguel A. (2003). *Caracterización y evolución anual del valor bromatológico de las Quercíneas Mediterráneas*. In: Pastos, desarrollo y conservación. Ed. Robles, A.B., Ramos, M.E., Morales, M.C., Simón de, E., González, J.L., Boza, J. Consejería de Agricultura y Pesca. Junta de Andalucía. Sevilla. p. 455-461.
- Cantos, E., Espin, J. C., López-Bote, C., de la Hoz, L., Ordonez, J. A., Tomas-Barberan, F. A. (2003). *Phenolic compounds and fatty acids from acorns (Quercus spp.), the main dietary constituent of free-ranged Iberian pigs*. Journal of Agricultural Food Chemistry, 51:6248–55.
- Capriles, V. D., dos Santos, F. G., Arêas, J. A. G. (2016) *Gluten-free breadmaking: Improving nutritional and bioactive compounds*. Journal of Cereal Science, 67, 83–91.
- Carapeto, A., Araújo, P.V., Clamote, F., Porto, M., Malveiro, S., Lourenço, J., Portela-Pereira, E., Holyoak, D.T. (2020). *Quercus suber L. - mapa de distribuição*. Flora-On: Flora de Portugal Interactiva, Sociedade Portuguesa de Botânica. <http://www.flora-on.pt/#wQuercus+suber>.
- Carbonero, M. D., Fernández, P., Bázquez, A., Navarro, R. (2003) *Evaluación de la producción y del calibre de bellotas de Quercus ilex L. subsp. ballota (Desf) Samp a lo largo de un ciclo de poda: Resultados de las campañas 2001–2002 y 2002–2003*. In XLIII Reunión Científica de la SEEP; Robles, A., Ramos, E., Morales, M.C., De Simón, E., González Rebollar, J.L., Boza, J., Eds.; Junta de Andalucía: Granada, Spain, 2003; pp. 645–650.
- Carvalho, F., Brown, K. A., Waller, M. P., Razafindratsima, O. H., Boom, A. (2020). *Changes in functional, phylogenetic and taxonomic diversities of lowland fens under different vegetation and disturbance levels*. Plant Ecology, 1-17.
- CGIAR-CSI global aridity database, <http://www.cgiar-csi.org/data/global-aridity-and-pet-database>
- Charef, M., Mohamed, Y., Saidi, M., Stocker, P. (2008). *Determination of the fatty acid composition of acorn (Quercus), Pistacia lentiscus seeds growing in Algeria*. Journal of the American Oil Chemists' Society, volume 85:921–4.
- Correia, P. R., Nunes, M. C., Beirão-da-Costa, M. L. (2013). *The effect of starch isolation method on physical and functional properties of portuguese nut starches. II. Q. rotundifolia Lam. and Q. suber Lam. acorns starches*. Food Hydrocoll 30:448–55.
- Correia, P., Leitão, A., Beirão-da-Costa, M. (2009). *Effect of drying temperatures on chemical and morphological properties of dried acorns flours*. International Journal of Food Science & Technology, 44(9): 1729–1736.
- Correia, P.R., Beirão-da-Costa, M.L. (2011). *Effect of Drying Temperatures on Starch-Related Functional and Thermal Properties of Acorn Flours*. Journal of Food Science. Vol. 76, n. 2. E196 - E202 pp.
- Costa, M., Morla, C., Sainz, H (Eds). (1997) *Los bosques ibéricos. Una interpretación geobotánica*. Editorial Planeta. Madrid. 597 pp.
- Damesin, C., Rambal, S., Joffre, R. (1997). *Between-tree variations in leaf  $\delta^{13}C$  of Quercus pubescens and Quercus ilex among Mediterranean habitats with different water availability*. Oecologia 111:26-35.
- David, T. S., Ferreira, M. I., Cohen, S., Pereira, J. S., David, J. S. (2004). *Constrations on transpiration on an evergreen oak tree in southern Portugal*. Agricultural and Forest Meteorology 122: 193-204.
- Davies, S. L., Turner, N. C., Palta, J. A., Siddique, K. H. M., Plummer, J. A. (2000). *Remobilisation of carbon and nitrogen supports seed filling in chickpea subjected to water deficit*. Australian Journal



- of Agricultural Research, 51(7), 855-866.
- de Oliveira, M. I. F., Machado, M., d'Abreu M. C. (2012). *Acorn chemical composition depending on shedding date and Quercus species*. In: De Pedro E.J. (ed.), Cabezas A.B. (ed.). 7th International Symposium on the Mediterranean Pig. Zaragoza: CIHEAM, 2012. p. 229-234 (Options Méditerranéennes: Série A. Séminaires Méditerranéens; n. 101).
- de Oliveira, T. E. G. (2014). *Estudo da bolota de Quercus rotundifolia Lam. como indicador precoce do stress hídrico ao longo de um gradiente climático no Alentejo (SE, Portugal)*. Tese em Biologia da Conservação. Faculdade de Ciências. Universidade de Lisboa.
- de Rigo, D., Caudullo, G., (2016). *Quercus ilex in Europe: distribution, habitat, usage and threats*. In: San-Miguel-Ayán, J., de Rigo, D., Caudullo, G., Houston Durrant, T., Mauri, A. (Eds.), European Atlas of Forest Tree Species. Publ. Off. EU, Luxembourg, pp. e014bcd+.
- Delgado-Baquerizo, M., Maestre, F. T., Gallardo, A., Quero, J. L., Ochoa, V., García-Gómez, M., Escolar, C., García-Palacios, P., Berdugo, M., Valencia, E. (2013). *Aridity modulates N availability in arid and semiarid Mediterranean grasslands*. PLoS ONE, 8, e59807.
- Delgado-Chavero, C. L., Zapata-Márquez, E., García-Casco, J. M., Paredes-Torronteras, A. (2013). *Statistical model for classifying the feeding systems of Iberian pigs through Gas Chromatography (GC-FID) and Isotope Ratio Mass Spectrometry (GC-C-IRMS)*. Grasas y Aceites, 64 (2), 157-165, 2013, issn: 0017-3495.
- Díaz Fernández, P. M. (2000). *Variabilidad de la fenología y del ciclo reproductor de Quercus suber L en la península Ibérica*. Thesis doctoral Departamento de Silvopascicultura, UPM. [<http://oa.upm.es/814>].
- Díaz, S., Cabido, M. (2001). *Vive la différence: plant functional diversity matters to ecosystem processes*. Trends in Ecology & Evolution, 16(11), 646-655.
- Díaz-Fernández, P. M., Climent, J., Gil, L. (2004) *Biennial acorn maturation and its relationship with flowering phenology in Iberian populations of Quercus suber*. Trees, 18, 615–621.
- Diefendorf, A. F., Mueller, K. E., Wing, S. L., Koch, P. L., Freeman K. H. (2010). *Global patterns in leaf <sup>13</sup>C discrimination and implications for studies of past and future climate*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 107(13), 5738-5743.
- Dietze, M. C., Sala, A., Carbone, M. S., Czimczik, C. I., Mantooth, J. A., Richardson, A. D., Vargas, R. (2014). *Nonstructural carbon in woody plants*. Annual Review of Plant Biology, 65, 667-687.
- Diretiva 92/43/CEE do Conselho, de 21 de maio de 1992, relativa à preservação dos habitats naturais e da fauna e da flora selvagens.
- Diretiva 2009/147/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 30 de Novembro de 2009 relativa à conservação das aves selvagens.
- Donovan, L. A., Ehleringer, J. R. (1994). *Carbon isotope discrimination, water-use efficiency, growth, and mortality in a natural shrub population*. Oecologia, 100(3), 347-354.
- Dormann, C. F., Elith, J., Bacher, S., Buchmann, C., Carl, G., Carré, G., García Marquéz, J. R., Gruber, B., Lafourcade, B., Leitão, P. J., Münkemüller, T., Maclean, C., Osborne, P. E., Reineking, B., Schröder, B., Skidmore, A. K., Zurell, D., Lautenbach, S. (2013). *Collinearity: A review of methods to deal with it and a simulation study evaluating their performance*. Ecography, 36: 27–46. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0587.2012.07348.x>
- Duodu, K. G., Taylor, J. R. N., Belton, P. S., Hamaker, B. R. (2003). *Factors affecting sorghum protein digestibility*. Journal of Cereal Science, 38, 117–131.
- EIP-AGRI HNV Final Report. EIP-AGRI Focus Group on High Nature Value - farming profitability: Final Report. 2016. Available at: <https://ec.europa.eu/eip/agriculture/en/publications/eip-agri-focus-group-high-nature-value-farming>
- Estévez, R. V., Martínez, A. G., Moreno, C. M., Muñoz, J. M., Castro, A. G. G. (2007). *Dimensiones y Características Nutritivas de las Bellotas de los Quercus de la Dehesa*. Archivos de Zootecnia. 57(R).
- European Environment Agency (EEA) (2017) *High nature value (HNV) farmland*.
- European Forum on Nature Conservation and Pastoralism (EFNCP) (2020) *High Nature Value Farming - What is HNS Farming?*
- Evans, R. D. (2001). *Physiological mechanisms influencing plant nitrogen isotope composition*. Trends in Plant Science, 6(3): 121-126.
- Fagan, K-A, Koops, MA, Arts, MT, Power, M. (2011) *Assessing the utility of C:N ratios for predicting*

- lipid content in fishes*. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 68(2), 374–385. doi:10.1139/F10-119.
- Fernández, I., Gómez, A., Moreno, P. (2005) Características de las bellotas de encina (*Quercus ilex*) en diferentes zonas del Valle de los Pedroches (Córdoba). Inventario bromatológico. In Pastos y Ganadería Extensiva, García, B., García, A., Vázquez, B. and Zabalgogazcoa, I. (eds). Gráficas Cervantes, SA. Salamanca. Spain, pp. 317–322.
- Ferreira-Dias, S., Valente, D. G., Abreu, J. M. F. (2003). *Pattern recognition of acorns from different Quercus species based on oil content and fatty acid profile*. Grasas y Aceites 54:384–91.
- Ferrio, J. P., Mateo, M. A., Bort, J., Abdalla, O., Voltas, J., Araus, J. L. (2007). *Relationships of grain  $\delta^{13}C$  and  $\delta^{18}O$  with wheat phenology and yield under water-limited conditions*. Annals of Applied Biology, 150(2), 207–215.
- Field, A. P. (2009). *Discovering statistics using SPSS*, 3re ed.. Sage publications, London, pp. 197–263.
- Galle, A., Florez-Sarasa, I., El Aououad, H., Flexas, J. (2011). *The Mediterranean evergreen Quercus ilex and the semideciduous Cistus albidus differ in their leaf gas exchange regulation and acclimation to repeated drought and re-watering cycles*. Journal of Experimental Botany 62 (14): 5207–5216.
- Gea-Izquierdo, G., Cañellas, I., Montero, G. (2006). *Acorn production in Spanish holm oak woodlands*. Invest. Agrar: Sist. Recur. For. 2006, 15, 339–354.
- Ghashghaie, J., Duranceau, M., Badeck, F. -W., Cornic, G., Adeline, M. -T., Deleens, E. (2001).  *$\delta^{13}C$  of  $CO_2$  respired in the dark in relation to  $\delta^{13}C$  of leaf metabolites: comparison between Nicotiana sylvestris and Helianthus annuus under drought*. Plant, Cell and Environment. 24:505–15
- Giovanetti, M., Alegria, C., Máguas, C. (2018). *The implementation of an international project: advances of REALMed in Portugal through sample collection, acorn analysis, multiple actors networking, outreach material design*. In: Book of Abstracts of the cE3c 4th Annual Meeting - Frontiers in E3, July 9–10, Lisboa, Portugal, pp. 48.
- González-Martin, I., Pérez, C. G., Méndez, J. H., González, C. S. (2001). *Differentiation of dietary regime of Iberian swine by means of isotopic analysis of carbon and sulphur in hepatic tissue*. Meat Science, 58(1), 25–30.
- Greenberg, C. H. (2000). *Individual variation in acorn production by five species of Southern Appalachian oaks*. Forest Ecology and Management 2000, 132, 199–210.
- Hannachi, L., Deléens, E., Gate, P. (1996). *Nitrogen and carbon isotope composition of wheat grain: alteration due to sink-source modifications at flowering*. Rapid communications in mass spectrometry, 10(8): 979–986.
- Herdade do Freixo do Meio (2020). Consultado em: <https://www.herdadedofreixodomeio.pt>
- Hernández, E. I., Vilagrosa, A., Pausas, J. G., Bellot, J. (2010). *Morphological traits and water use strategies in seedlings of Mediterranean coexisting species*. Plant Ecology, 207(2), 233–244.
- Hernández, E. I., Vilagrosa, A., Pausas, J. G., Bellot, J. (2010). *Morphological traits and water use strategies in seedlings of Mediterranean coexisting species*. Plant Ecology, 207(2). 233–244.
- Hilmarsson, H., Traustason, B., Kristmundsdottir, T., Thormar, H. (2007). *Virucidal activities of medium- and long-chain fatty alcohols and lipids against respiratory syncytial virus and parainfluenza virus type 2: comparison at different pH levels*. Archives of Virology, 152:2225–36.
- Houston Durrant, T., de Rigo, D., Caudullo, G., (2016). *Quercus suber in Europe: distribution, habitat, usage and threats*. In: San-Miguel-Ayán, J., de Rigo, D., Caudullo, G., Houston Durrant, T., Mauri, A. (Eds.), European Atlas of Forest Tree Species. Publ. Off. EU, Luxembourg, pp. e01ff11+
- Huntington, T. G. (2006). *Evidence for intensification of the global water cycle: review and synthesis*. Journal of Hydrology, 319, 83–95.
- ICNF, 2019. IFN6 – 6º Inventário Florestal Nacional, Resultados; Região Plano – NUTS II (pdf), 105pp, Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas. Lisboa.
- ICNF, Distinção entre *Quercus rotundifolia* Lam. (azinheira ou sardão), *Quercus suber* L. (sobreiro) e *Quercus coccifera* L. (carrasco).
- IPCC (2007) *Synthesis Report*. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change (Cambridge Univ Press, Cambridge, UK).
- IPCC (2019). *Summary for Policymakers*. In: Climate Change and Land: an IPCC special report on climate change, desertification, land degradation, sustainable land management, food security, and greenhouse gas fluxes in terrestrial ecosystems [P.R. Shukla, J. Skea, E. Calvo Buendia, V. Masson-

- Delmotte, H.- O. Pörtner, D. C. Roberts, P. Zhai, R. Slade, S. Connors, R. van Diemen, M. Ferrat, E. Haughey, S. Luz, S. Neogi, M. Pathak, J. Petzold, J. Portugal Pereira, P. Vyas, E. Huntley, K. Kissick, M. Belkacemi, J. Malley, (eds.)). In press.
- Ja Kwak, M., Han Lee, S., Young Woo, S. (2011). *Growth and anatomical characteristics of different water and light intensities on cork oak (Quercus suber L.) seedlings*. African Journal of Biotechnology Vol. 10(53), pp.
- Jackson, J. E. (Ed.) (1991). *A User's to Principal Components*. John Wiley & Sons, New York.
- Jardim Botânico da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD), Flora Digital de Portugal, *Espécie Quercus rotundifolia*.
- Jawarmeh, M. S., Brake, M. H., Muhaidat, R., Migdadi, H. M., Lahha, J. N., El-Oqlah, A. A. (2013). *Characterization of Quercus species distributed in Jordan using morphological and molecular markers*. African Journal of Biotechnology, 12:1326–34.
- Jongen, M., Unger, S., Fangueiro, D., Cerasoli, S., Silva J. M.N., Pereira, J. S. (2013) *Resilience of montado understorey to experimental precipitation variability fails under severe natural drought*. Agriculture Ecosystems & Environment, 178:18-30.
- Kennedy, P. G., Hausmann, N.J., Wenk, E. H., Dawson, T.E. (2004). *The importance of seed reserves for seedling performance: an integrated approach using morphological, physiological, and stable isotope techniques*. Oecologia. 141:547–554.
- Korus, A., Gumul, D., Krystyjan, M., Juszczak, L., Korus, J. (2017). *Evaluation of the quality, nutritional value and antioxidant activity of gluten-free biscuits made from corn-acorn flour or corn-hemp flour composites*. European Food Research and Technology, 243, 1–10.
- Korus, J., Witczak, M., Ziobro, R., Juszczak, L. (2015). *The influence of acorn flour on rheological properties of gluten-free dough and physical characteristics of the bread*. European Food Research and Technology, 240:1135–1143.
- Kris-Etherton, P. M., Hecker, K. D., Bonanome, A., Coval, S. M., Binkoski, A. E., Hilpert, K. F., Griel, A. E., Etherton, T. D. (2002). *Bioactive compounds in foods: Their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer*. The American Journal of Medicine, 113(9B): 71S-88S.
- Lange, O.L., Tenhunen, J.D., Braun, M. (1982). *Midday Stomatal Closure in Mediterranean Type Sclerophylls under Simulated Habitat Conditions in an Environmental Chamber: I. Comparison of the Behaviour of Various European Mediterranean Species*. Flora, 172(6), 563-579, doi: 10.1016/S0367-2530(17)31366-X.
- Larrigaudière, C., Lenthéric, I., Puy, J., Pintó, E. (2004). *Biochemical characterisation of core browning and brown heart disorder in pear by multivariate analysis*. Postharvest Biology & Technology, 31:29–39. doi: 10.1016/S0925-5214(03)00132-7.
- Lofthouse, V., Prendeville, S. (2018). *Human-Centred Design of Products and Services for the Circular Economy – A Review*. The Design Journal, 21(4):451-476, <https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/14606925.2018.1468169?needAccess=true>
- Lopez-Iglesias, B., Villar, R., Poorter, L. (2014). *Functional traits predict drought performance and distribution of Mediterranean woody species*. Acta Oecologica, 56, 10-18.
- LPN (2007). Silva, J. S. (coord. ed.). (2007). *Os montados: muito para além das árvores*. Árvores e Florestas de Portugal, n.º 3, Lisboa: Público, SA, FLAD, LPN. 177-209.
- Lutze, J. L., Gifford, R. M. (1998). *Acquisition and allocation of carbon and nitrogen by Danthonia richardsonii in response to restricted nitrogen supply and CO2 enrichment*. Plant, Cell & Environment, 21(11), 1133-1141.
- Madeira, F. G. P. da S. (2015). *Inovação e Lançamento de Novos Produtos no Mercado Alimentar: Plano de Marketing para o Lançamento de um Novo Produto da Marca Maggi da Nestlé Portugal*. Tese de Mestrado em Ciências Empresariais. Instituto Superior de Economia e Gestão, Universidade de Lisboa.
- Máguas, C., Rascher, K. G., Martins-Loução, A., Carvalho, P., Pinho, P., Ramos, M., Correia, O., Werner, C. (2011). *Responses of woody species to spatial and temporal ground water changes in coastal sand dune systems*. Biogeosciences, 8, 3823–3832. <https://doi.org/10.5194/bg-8-3823-2011>
- Maire, V., Gross, N., Hill, D., Martin, R., Wirth, C., Wright, I. J., Soussana, J. -F. (2013a). *Disentangling coordination among functional traits using an individual-centred model: impact on plant performance at intra- and inter-specific levels*. PLoS One 8(10):e77372. doi:10.1371/journal.pone.0077372

- Maire, V., Soussana, J.-F., Gross, N., Bachelet, B., Pagès, L., Martin, R., Reinhold, T., Wirth, C., Hill, D. (2013b). *Plasticity of plant form and function sustains productivity and dominance along environment and competition gradients. A modeling experiment with Gemini*. Ecological Modelling, 254:80–91. doi:10.1016/j.ecolmodel.2012.03.039
- Martínez-Vilalta, J., Sala, A., Asensio, D., Galiano, L., Hoch, G., Palacio, S., Lloret, F. (2016). *Dynamics of non-structural carbohydrates in terrestrial plants: a global synthesis*. Ecological Monographs, 86(4): 495-516.
- Martínez-Vilalta, J., Sala, A., Asensio, D., Galiano, L., Hoch, G., Palacio, S., Lloret, F. (2016). *Dynamics of non-structural carbohydrates in terrestrial plants: a global synthesis*. Ecological Monographs, 86(4), 495-516.
- Martins, R. B., Gouvinhas, I., Nunes, M. C., Peres, J. A., Raymundo, A., Barros, A. I. R. N. A., (2020). *Acorn Flour as a Source of Bioactive Compounds in Gluten-Free Bread*. Molecules 25, 3568. <https://doi.org/10.3390/molecules25163568>
- Matos, M. E., Rosell, C. M. (2015). *Understanding gluten-free dough for reaching breads with physical quality and nutritional balance*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 95:653–61.
- Mayor, J. R., Schuur, E. A., Henkel, T. W. (2009). *Elucidating the nutritional dynamics of fungi using stable isotopes*. Ecology Letters, 12(2), 171-183.
- Mediavilla, S., Escudero, A. (2004). *Stomatal responses to drought of mature trees and seedlings of two co-occurring Mediterranean oaks*. Forest Ecology and Management, Volume 187, Issues 2–3, 23, Pages 281-294.
- Melhorado, F., Moreira, T. (2007). *Padrão sazonal do regime estomático em azinheiras (Quercus rotundifolia Lam.) regadas*. Revista de Ciências Agrárias [online], vol.30, n.1, pp.212-222. ISSN 0871-018X.
- Merouani, H., Apolinário, L. M., Almeida, M. -H., Pereira, J. S. (2003). *Morphological and physiological maturation of acorns of cork oak (Quercus suber L.)*. Seed Science and Technology, 2003, 31(1), 111–124.
- Metz, J., Liancourt, P., Kigel, J., Harel, D., Sternberg, M., Tielbörger, K. (2010). *Plant survival in relation to seed size along environmental gradients: a long-term study from semi-arid and Mediterranean annual plant communities*. Journal of Ecology, 98(3), 697–704.
- Morais, E. C., Cruz, A. G., Bolini, H. M. A. (2013). *Gluten-free bread: multiple time-intensity analysis, physical characterisation and acceptance test*. International Journal of Food Science & Technology, 48:2176–84.
- Naqash, F., Gani, A., Gani, A., Masoodi, F. A. (2017) *Gluten-free baking: Combating the challenges—A review*. Trends in Food Science & Technology, 66, 98–107.
- Nasri, N., Fady, B., Triki, S. (2007). *Quantification of sterols and aliphatic alcohols in Mediterranean stone pine (Pinus pinea L.) populations*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55:2251–5.
- Natividade, J. V. (1990). Subericultura. Ministério da Agricultura Pescas e Alimentação, DGF, 2ª edição, Lisboa, 387 pp.
- Nunes, A., Köbel, M., Pinho, P., Matos, P., de Bello, F., Correia, O., Branquinho, C. (2017). *Which plant traits respond to aridity? A critical step to assess functional diversity in Mediterranean drylands*. Agricultural and Forest Meteorology, 239: 176-184.
- O’Shea, N., Arendt, E., Gallagher, E. (2014). *State of the Art in Gluten-Free Research*. Journal of Food Science, 79, 1067–1075.
- Ofcarcik, R. P., Burns, E. E., Teer, J. G. (1971). Acorns for human food. Food Industries Journal 4:18-19.
- Ogaya, R., Peñuelas, J. (2008). Changes in leaf  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$  for three Mediterranean tree species in relation to soil water availability. Acta Oecologica, 34(3), 331-338.
- Orczykowska, M., Dziubiński, M. (2013). Comparison of Viscoelastic Properties of Chestnut and Acorn Starch by Means of Mechanical Models with an In-built Springpot. Applied Rheology, 24, 24766
- Ostlund, R., Lin, X. (2006). *Regulation of cholesterol absorption by phytosterols*. Current Atherosclerosis Reports, 8:487–91.
- Paracchini, M. L., Petersen, J. -E., Hoogeveen, Y., Bamps, C., Burfield, I., Van Swaay, C. (2008). *High Nature Value Farmland in Europe e an Estimate of the Distribution Patterns on the Basis of Land Cover and Biodiversity Data*. JRC Scientific and Technical Reports. Joint Research Centre - Institute for Environment and Sustainability, Luxembourg, 87 pp.

- Pardo, L. H., Templer, P. H., Goodale, C. L., Duke, S., Groffman, P. M., Adams, M. B., Compton J. (2006). *Regional Assessment of N Saturation using Foliar and Root  $\delta^{15}N$* . Biogeochemistry, 80(2), 143-171.
- Pardos, M., Jiménez, M. D., Aranda, I., Puértolas, J., Pardos, J. A. (2004). *Water relations of cork oak (Quercus suber L.) seedlings in response to shading and moderate drought*. Ann. For. Sci. 62 (2005) 377-384.
- Pasqualone, A., Makhoul, F. Z., Barkat, M., Difonzo, G., Summo, C., Squeo, G., Caponio, F. (2019). *Effect of acorn flour on the physico-chemical and sensory properties of biscuits*. Heliyon, 5, e02242.
- Passarinho J. A., Calha I. M., Moreira A.C., (2019). *Montado: Produção de bolota e silvopastorícia*. Dossier Técnico – Vida Rural – INIAV, I.P. 42 – 45 pp.
- Patón, D., García-Herrera, R., Cuenca, J., Galavis, M., Roig, F. A. (2009). *Influence of Climate on Radial Growth of Holm Oaks (Quercus ilex subsp. ballota desf) From SW Spain*. GEOCHRONOMETRIA 34, pp 49-56.
- Paulo, J. A., Crous-Duran, J., Firmino, P. N., Faias, S. P., Palma, J. H. N., (2016). *System Report: Cork Oak Silvopastoral Systems in Portugal*. AGFORWARD (613520). 2: High Nature and Cultural Value Agroforestry. Montado in Portugal.
- Pereira, J. S., Barros, M. C., Rodrigues, J. M. (1999). *As Causas da morte do Sobreiro Revisitadas*. Revista Florestal 12: 20-24.
- Pereira, J. S., Correia, A. V., Correia, A. P., Branco, M., Bugalho, M., Caldeira, M. C., Cruz, C. S., Freitas, H., Oliveira, A. C., Pereira, J. M. C., Reis, R. M., Vasconcelos, M. J. (2002). *Ecological processes affecting the survival of key forest species*. In F.D. Santos, K. Forbes, R. Moita (eds) Climate Change in Portugal Scenarios, Impacts and Adaptations Measures SIAM Project, pp. 385-387. Gradiva, Lisboa.
- Pereira, S. de C. F. S. (2017). *Análise da Consciência Ambiental e do Consumo Verde em Portugal - Fatores Comprobatórios e Perfil de Consumidor Verde*. Tese de Mestrado em Estatística e Gestão de Informação, Especialização em Estudos de Mercado e Gestão do Relacionamento com o Cliente. NOVA Information Management School - Instituto Superior de Estatística e Gestão de Informação, Universidade Nova de Lisboa.
- Pérez-Ramos, I. M., Matías, L., Gómez-Aparicio, L., Godoy, Ó. (2019). Functional traits and phenotypic plasticity modulate species coexistence across contrasting climatic conditions. Nature Communications, 10(1), 2555.
- Petroselli, A., Vessella, F., Cavagnuolo, L., Piovesan, G., Schirone, B. (2013). *Ecological behavior of Quercus suber and Quercus ilex inferred by topographic wetness index (TWI)*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Phillips, K. M., Ruggio, D. M., Ashraf-Khorassani, M. (2005). *Phytosterol composition of nuts and seeds commonly consumed in the United States*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53:9436-45.
- Pinto-Correia, T. (1993). *Threatened landscape in Alentejo, Portugal: the 'montado' and other 'agro-silvo-pastoral' systems*. Landscape and Urban Planning, 24(1-4), 43-48.
- Pinto-Correia, T., Ribeiro, N., Sá-Sousa, P. (2011) *Introducing the montado, the cork and holm oak agroforestry system of Southern Portugal*. Agrofor Syst 82:99-104. [doi: 10.1007/s10457-011-9388-1].
- Popović, B. M., Štajner, D., Zdero, R., Orlović, S., Galić, Z. (2013). *Antioxidant Characterization of Oak Extracts Combining Spectrophotometric Assays and Chemometrics*. Hindawi Publishing Corporation. The Scientific World Journal. Volume 2013, Article ID 134656, 8 pages.
- PORDATA, Base de Dados Portugal Contemporâneo. Municípios. Ambiente, Energia e Território. Território e Ordenamento.
- Porto, M., Araújo, P. V., Carapeto, A., Clamote, F., Pereira, A. J., Holyoak, D. T., Almeida, J. D., Malveiro, S. (2020). *Quercus rotundifolia* Lam. - mapa de distribuição. Flora-On: Flora de Portugal Interactiva, Sociedade Portuguesa de Botânica. <http://www.flora-on.pt/#wQuercus+rotundifolia>. Consulta realizada em 3/10/2020
- QGIS 3.14 - Sistema de Informação Geográfica, Quantum Gis 3.14.16. [https://qgis.org/pt\\_PT/site/index.html#\(VER+LOCALIZAÇÃO!\)](https://qgis.org/pt_PT/site/index.html#(VER+LOCALIZAÇÃO!))
- Rababah, T., Ereifej, K., Al-Mahasneh, M., Alhamad, M., Alrababah, M., Al-udatt, M. (2008). *The physicochemical composition of acorns for two Mediterranean Quercus species*. Jordan Journal of

- Agricultural Sciences, 4:131–7.
- Rabhi, F., Narvaez-Rivas, M., Tlili, N., Boukhchina, S., Leon-Camacho, M. (2016). *Sterol, aliphatic alcohol and tocopherol contents of Quercus ilex and Quercus suber from different regions*. Industrial Crops and Products, 83:781–6.
- Rakić, S., Maletić, R., Perunović, M., Svrzić, G. (2004) *Influence of Thermal Treatment on Tannin Content and Antioxidation Effect of Oak Acorn Quercus Cerris Extract*. Journal of Agricultural Sciences, Vol. 49, No 1, Pages 97-107.
- Rakić, S., Petrović, S., Kukić, J., Jadranin, M., Tešević, V., Povrenović, D., Šiler-Marinković, S. (2006). *Influence of thermal treatment on phenolic compounds and antioxidant properties of oak acorns from Serbia*. Food Chemistry, 104: 830-834. doi:10.1016/j.foodchem.2007.01.025
- Rashid, R. M. S., Sabir, D. A., Hawramee, O. K. (2014). *Effect of sweet acorn flour of common oak (Quercus aegilops L.) on locally Iraqi pastry (kulicha) products*. Journal of Zankoy Sulaimani, 16:244–9.
- Recio, C., Martín, Q., Raposo, C. (2013). *GC-C-IRMS analysis of FAMES as a tool to ascertain the diet of Iberian pigs used for the production of pork products with high added value*. Grasas y Aceites, 64 (2), special issue, 181-190, 2013, issn: 0017-3495.
- Robinson, D. (2001).  $\delta^{15}\text{N}$  as an integrator of the nitrogen cycle. Trends in Ecology & Evolution, 16(3), 153-162.
- Rodrigues, C, Maia, R, Ribeirinho, M, Hildebrandt, P, Gautz, L, Prohaska, T & Máguas, C. (2013). Coffee. In Comprehensive Analytical Chemistry (Vol. 60, pp. 573-598). Elsevier.
- Rodrigues, C., Brunner, M., Steiman, S., Bowen, G., Nogueira, J.M.F., Gautz, L., Prohaska, T., Máguas C. (2011b). *Isotopes as tracers of the Hawaiian coffee-producing regions*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59, 10239-10246. Doi:10.1021/jf200788p
- Rodrigues, C., Máguas, C., Prohaska, T. (2011a). *Strontium and oxygen isotope fingerprinting of green coffee beans and its potential to proof authenticity of coffee*. European Food Research and Technology, 232, 361. Doi:10.1007/s00217-010-1362-z
- Rodrigues, C., Maia, R., Ribeirinho, M., Hildebrandt, P., Gautz, L., Prohaska, T., Máguas, C. (2013). Coffee. In Comprehensive Analytical Chemistry (Vol. 60, pp. 573-598). Elsevier.
- Rodríguez-Estévez, V., García, A., Perea, J., Mata, C., Gómez, A.G. (2007). *Acorn production at the dehesa: influential factors*. Archivos de Zootecnia, 56R, 25–43.
- Rosenberg, D. (2008). The possible use of acorns in past economies of the southern levant: a staple food or a negligible food source? Levant, 40:167–75.
- Rstudio v1.3.1093 – RStudio, PBC, Boston, Massachusetts, EUA. <https://rstudio.com/>
- Ruiz de la Torre, J. (2006). *Flora Mayor*. Ministerio de Medio Ambiente. Parques Nacionales. Madrid.
- Saffarzadeh, A., Vincze, L., Csapo, J. (1999). *Determination of the chemical composition of acorn (Quercus branti), Pistacia atlantica and Pistacia Khinj seeds as non-conventional feedstuffs*. Acta Agraria Kaposváriensis, 3(3):59–69.
- Schulze, E. -D., Farquhar, G. D., Miller, J. M., Schulze, W., Walker, B. H., Williams, R. J. (1999). *Interpretation of increased foliar  $\delta^{15}\text{N}$  in woody species along a rainfall gradient in northern Australia*. Australian Journal of Plant Physiology, 26:296-298. <http://hdl.handle.net/102.100.100/212252?index=1>
- Silva, S., Costa, E. M., Borges, A., Carvalho, A. P., Monteiro, M. J., Pintado, M. M. E. (2016). *Nutritional characterization of acorn flour (a traditional component of the Mediterranean gastronomic folklore)*. Springer Science+Business Media New York.
- Skendi, A., Mouselimidou, P., Papageorgiou, M., Papastergiadis, E. *Effect of acorn meal-water combinations on technological properties and fine structure of gluten-free bread*. Food Chemistry, 253, 119–126.
- Sottomayor, M. (2015). *Potencial Económico da Bolota em Portugal: Análise Exploratória*. [PowerPoint presentation] 1st Symposium A Bolota: o futuro de um alimento com passado. Montemor-o-Novo, Portugal, 20 de Março, 2015. In Azevedo A (ed.), Frutos Silvestres Comestíveis-Guia Prático. Quercus Publication.
- StatSoft, Inc. (2007). STATISTICA (data analysis software system), version 8.0. [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com).
- Švec, I., Hrušková, M., Kadlčíková, I. (2018). *Features of flour composites based on the wheat or wheat-barley flour combined with acorn and chestnut*. Croatian journal of food science and technology, 10(1), 89–97.

- Swain, T., Hillis, W. E. (1959). *The phenolic constituents of Prunus domestica 1. The quantitative analysis of phenolic constituents*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 10: 63–68.
- Tejerina, D., Garc'ia-Torres, S., Vaca, M. C., V'asquez, F. M., Cava, R. (2011). *Acorns (Quercus rotundifolia Lam.) and grass as natural sources of antioxidants and fatty acids in the "montanera" feeding of Iberian pig: intra- and inter-annual variations*. Food Chemistry, 124:997–1004.
- Tenhunen, J. D., Lange, O. L., Braun, M., Meyer, A., Löscher, R., Pereira, J. S. (1980) *Midday stomatal closure in Arbutus unedo leaves in a natural macchia and under simulated habitat conditions in an environmental chamber*. Oecologia 47:365–367. [doi: 10.1007/BF00398530].
- Trabucco, A., Zomer, R. (2019). *Global Aridity Index and Potential Evapotranspiration (ET0) Climate Database v2 Figshare Fileset*. Available online: <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.7504448.v3>
- Tsao, R. (2010). *Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols*. Nutrients, 2: 1231-1246. doi:10.3390/nu2121231.
- Ubert, M., Courraud, R. (1994). *Élagage et taille de formation des arbres forestiers*. Institut pour le Développement Forestier (2<sup>a</sup> édition), Paris, 303 pp.
- United Nations (2015). *Transforming Our World: The 2030 Agenda For Sustainable Development*. A/RES/70/1.
- United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization – World Heritage Convention. (2017). *Montado, Cultural Landscape*.
- Vázquez, F.M., (1998). *Producción de bellota en Quercus II. Aportación al conocimiento de sus plagas en el sur de la península ibérica*. Solo cerdo ibérico, 1, 67-75.
- Vinha, A. F., Barreira, J. C. M., Costa, A. S. G., Oliveira, M. B. P. P. (2016). *A New Age for Quercus spp. Fruits: Review on Nutritional and Phytochemical Composition and Related Biological Activities of Acorns*. Comprehensive Reviews on Food Science and Food Safety, 15:947-981.
- Violle, C., Navas, M. L., Vile, D., Kazakou, E., Fortunel, C., Hummel, I., Garnier, E. (2007). *Let the concept of trait be functional!*. Oikos, 116(5), 882-892.
- Volin, P. (2001). *Analysis of steroidal lipids by gas and liquid chromatography*. Journal of Chromatography A, 935:125–40.
- Volis, S & Bohrer, G. (2013). *Joint evolution of seed traits along an aridity gradient: seed size and dormancy are not two substitutable evolutionary traits in temporally heterogeneous environment*. New Phytologist, 197(2): 655-667.
- Wang, C. Y., Chen, C., Wang, S. Y. (2009). *Changes of flavonoid content and antioxidant capacity in blueberries after illumination with UV-C*. Food Chemistry, 117: 426-431.
- Werger, MJA & Hirose, T. (1991). *Leaf nitrogen distribution and whole canopy photosynthetic carbon gain in herbaceous stands*. Vegetatio, 97(1): 11-20.
- Werner, C., Máguas, C., (2010). *Carbon isotope discrimination as a tracer of functional traits in a Mediterranean macchia plant community*. Functional Plant Biology, 37(5), 467-477.
- Werner, C., Schnyder, H., Cuntz, M., Keitel, C., Zeeman, M. J., Dawson, T. E., Badeck, F. -W., Brugnoli, E., Ghashghaie, J., Grams, T. E. E., Kayler, Z. E., Lakatos, M., Lee, W., Máguas, C., Ogée, J., Rascher, K. G., Siegwolf, R. T. W., Unger, S., Welker, J., Wingate, L., Gessler, A. (2012). *Progress and challenges in using stable isotopes to trace plant carbon and water relations across scales*. Biogeosciences, 9 (8), 3083–3111.
- Werner, R., Schmidt, H. L., Rossmann, A. (2001). *<sup>18</sup>O pattern and biosynthesis of natural plant products*. Phytochemistry 58:9–32.
- World Clim database, <https://www.worldclim.org/>
- Zhu, C., Lei, M., Andargie, M., Zeng, J., Li, J. (2019). *Antifungal activity and mechanism of action of tannic acid against Penicillium digitatum*. Physiological and Molecular Plant Pathology, 107 (2019) 46–50.

# Anexos

## Anexo 1

**Tabela A 1** Coordenadas (latitude (Y) e longitude (X); graus decimais) dos pontos amostrados para as espécies *Q. rotundifolia* (amarelo) e *Q. suber* (verde).

<i>Q. rotundifolia</i> Coordenadas			<i>Q. suber</i> Coordenadas		
ID_Am	Latitude	Longitude	ID_Am	Latitude	Longitude
MR01	38.664167	-8.094722	MS01	38.653611	-8.097778
MR02	38.653611	-8.097778	MS02	38.767222	-7.710556
MR03	38.590833	-7.894722	MS03	38.677778	-7.334722
MR04	38.871111	-7.564167	MS04	38.701667	-7.914722
MR05	39.098056	-7.436944	MS05	38.936111	-8.125000
MR06	39.140833	-7.364722	MS06	38.956111	-8.106667
MR07	38.841389	-7.191389	MS07	38.883889	-8.173889
MR08	38.677778	-7.334722	MS08	38.295833	-7.723889
MR09	38.674722	-7.484722	MS09	37.577222	-7.679722
MR10	38.420556	-7.478056	MS10	37.912222	-7.744722
MR11	38.392778	-7.331389	MS11	37.790000	-8.323611
MR12	38.201667	-7.184722	MS12	39.397778	-7.931389
MR13	38.154444	-7.105278	MS13	39.211667	-7.933889
MR14	38.108611	-7.055556	MS14	39.322500	-7.426111
MR15	38.080833	-7.150833	MS15	39.088611	-8.162222
MR16	38.134167	-7.426944	MS16	39.193056	-7.994444
MR17	38.700000	-7.929167	MS17	39.055000	-7.893611
MR18	38.921667	-8.083889	MS18	38.987778	-8.026944
MR19	38.883889	-8.173889	MS19	38.958333	-8.198056
MR20	38.110833	-7.624444	MS20	38.735278	-8.618889
MR21	37.840000	-7.513611	MS21	38.175572	-7.015571
MR22	37.577222	-7.679722	MS22	38.318220	-7.830210
MR23	37.685833	-7.727500	MS23	38.422483	-7.834663
MR24	37.920000	-7.490556	MS24	38.456099	-8.161383
MR25	37.912222	-7.744722	MS25	38.108181	-8.569174
MR26	37.903333	-7.869444			
MR27	37.691667	-8.301111			
MR28	37.894444	-8.135000			
MR29	38.184444	-8.108611			
MR30	39.216667	-7.793056			
MR31	39.048056	-7.446667			
MR32	39.051111	-7.653611			
MR33	38.958333	-8.198056			
MR34	38.175572	-7.015571			
MR35	38.213434	-7.364985			
MR36	38.175220	-7.414210			
MR37	38.318220	-7.830210			
MR38	38.359296	-7.835749			
MR39	38.422483	-7.834663			
MR40	38.456099	-8.161383			
MR41	38.517046	-8.079714			
MR42	38.108181	-8.569174			

ID\_Am – identificação da amostra composta.



**Tabela A 2** Valores médios e respetivo desvio padrão das respostas morfológicas da espécie *Quercus rotundifolia*.

ID_Am	Comprimento (mm)	Diâmetro (mm)	Volume (cm <sup>3</sup> )	Peso (g)
MR01	8.1 ±0.42	43.22 ±3.49	16.63 ±1.33	6.32 ±1.16
MR02	37.37 ±3.31	17.94 ±1.66	6.34 ±1.25	8.91 ±1.21
MR03	41.56 ±3.31	16.05 ±0.74	5.61 ±0.58	8.45 ±1.1
MR04	38.71 ±3.71	15.55 ±1.7	4.99 ±1.37	7.15 ±2.26
MR05	38.45 ±1.26	18.65 ±0.86	7.03 ±0.79	10.87 ±0.66
MR06	39.55 ±3.18	17.79 ±1.84	6.65 ±1.56	9.72 ±1.57
MR07	37.68 ±4.73	16.66 ±3.97	5.99 ±3.17	8.52 ±3.75
MR08	40.01 ±3.41	18.04 ±1.05	6.86 ±1.14	8.91 ±0.43
MR09	40.19 ±3.23	14.82 ±1.54	4.67 ±1.05	6.78 ±1.22
MR10	39.16 ±3.79	16.18 ±2.28	5.53 ±1.9	8.09 ±2.28
MR11	41.97 ±4.93	16.78 ±1.98	6.29 ±1.82	7.56 ±2.68
MR12	39.13 ±4.44	16.33 ±3.87	5.95 ±2.94	9.26 ±4.14
MR13	37.37 ±4.12	17.56 ±1.43	6.07 ±1.21	8.13 ±1.12
MR14	38.99 ±3.9	16.75 ±1.53	5.82 ±1.4	7.71 ±1.55
MR15	37.92 ±2.42	16.7 ±2.31	5.67 ±1.66	8.39 ±2.39
MR16	36.33 ±3.02	15.28 ±1.23	4.51 ±0.97	6.6 ±1.1
MR17	39.29 ±4.14	17.29 ±2.44	6.39 ±2.16	8.52 ±2.72
MR18	37.95 ±6.55	17.69 ±2.83	6.67 ±2.99	8.87 ±4.58
MR19	36.51 ±3.18	16.39 ±2.42	5.3 ±1.78	7.66 ±2.66
MR20	33.69 ±4.41	13.72 ±1.57	3.42 ±1.11	4.77 ±1.57
MR21	38.81 ±4.66	15.62 ±2.07	5.15 ±1.8	7.11 ± 2.35
MR22	39.07 ±4.64	15.46 ±1.92	5.09 ±1.92	7.94 ± 2.82
MR23	36.6 ±2.74	15.67 ±1.59	4.77 ±1.14	6.73 ±1.36
MR24	40.38 ±4.43	17.28 ±2.9	6.64 ±2.77	9.14 ±3.25
MR25	37.93 ±4.4	17.26 ±2.08	6.1 ±2.01	9.13 ± 2.53
MR26	41.62 ±3.01	16.29 ±1.35	5.85 ±1.18	8.48 ±1.21
MR27	38.39 ±4.14	16.81 ±1.55	5.76 ±1.4	7.87 ± 1.66
MR28	36.96 ±2.94	15.53 ±1.59	4.75 ±1.14	6.93 ±1.04
MR29	42.61 ±3.72	17.42 ±1.88	6.89 ±1.81	10.51 ±2.95
MR30	34.11 ±2.39	15.51 ±1.76	4.39 ±1.14	6.98 ±1.36
MR31	35.75 ±3.67	16.67 ±2.51	5.41 ±2.02	7.81 ±3.1
MR32	35 ±4.17	15.48 ±2.4	4.57 ±1.75	6.83 ±2.28
MR33	41.4 ±1.63	17.46 ±1.31	6.67 ±1.13	9.48 ±0.87
MR34	-	-	-	6.71 ±2.87
MR35	-	-	-	7.44 ±2.2
MR36	-	-	-	7.1 ±0.89
MR37	-	-	-	5.43 ±0.96
MR38	-	-	-	9.47 ±2.14
MR39	-	-	-	7.17 ±1.09
MR40	-	-	-	12.36 ±3.41
MR41	-	-	-	10.77 ±3.95
MR42	-	-	-	6.63 ±1.49

ID\_Am – identificação da amostra composta.

**Tabela A 3** Valores médios e respetivo desvio padrão das respostas químicas da espécie *Quercus rotundifolia*.

ID_Am	Sacarose (mg/g)	Glucose (mg/g)	Frutose (mg/g)	Amido (mgEG/g)	A Totais (mg/g)	A Sol (%)	A Insol (%)	CFT (mgEAG/g)	CFNT (mgEAG/g)	CT (mgEAG/g)	Proteína (%)
MR01	14.62 ±0.41	10.78 ±0.48	12.5 ±1.84	62.88 ±5.11	100.78 ±4.42	37.68 ±2.41	62.32 ±2.41	36.18 ±2.6	5.32 ±0.55	30.86 ±2.08	6.3
MR02	21.34 ±1.74	8.77 ±0.02	11.74 ±0.24	69.73 ±1.95	111.57 ±3.38	37.5 ±0.64	62.5 ±0.64	36.32 ±2.07	4.87 ±0.33	31.45 ±2.37	5.0
MR03	4.7 ±0.77	10.65 ±0.46	14.72 ±0.38	75.73 ±1.86	105.8 ±2.27	28.43 ±0.48	71.57 ±0.48	34.77 ±0.81	4.94 ±0.32	29.83 ±1.03	6.3
MR04	21.45 ±1.37	8.12 ±0.76	11.98 ±0.97	82.85 ±6.37	124.4 ±7.87	33.44 ±0.92	66.56 ±0.92	24.99 ±1.69	3.49 ±0.5	21.5 ±1.23	5.6
MR05	4.1 ±0.39	13.02 ±0.16	15.56 ±1.08	77.06 ±7.8	109.73 ±6.74	29.88 ±2.83	70.12 ±2.83	37.19 ±2.45	4.63 ±0.29	32.56 ±2.21	6.3
MR06	11.61 ±4.14	5.12 ±1.76	10.14 ±3.61	75.41 ±6.87	102.28 ±3.83	26.12 ±8.58	73.88 ±8.58	31.39 ±0.55	4.54 ±0.63	26.84 ±0.25	5.6
MR07	18.73 ±1.23	7.01 ±0.22	21.4 ±2.53	83.76 ±12.06	130.9 ±15.23	36.13 ±1.93	63.87 ±1.93	38.6 ±2.02	4.51 ±0.38	34.09 ±2.04	4.4
MR08	3.73 ±0.42	9.48 ±1.03	15.39 ±0.48	81.58 ±5.67	110.18 ±5.03	26.01 ±1.8	73.99 ±1.8	31.94 ±1.67	4.39 ±0.48	27.55 ±1.26	5.0
MR09	0 ±0.00	10.54 ±0.55	15.2 ±0.4	79.5 ±7.84	105.23 ±7.96	24.54 ±1.67	75.46 ±1.67	29.86 ±1.08	4.33 ±0.41	25.53 ±0.68	5.6
MR10	2.63 ±0.02	6.38 ±0.52	13.01 ±0.54	79.83 ±2.67	101.84 ±2.06	21.63 ±1.05	78.37 ±1.05	26.28 ±1.1	4.51 ±0.56	21.77 ±1.61	5.6
MR11	3.15 ±0.54	9.23 ±0.47	11.09 ±0.81	78.1 ±3.05	101.57 ±3.93	23.1 ±0.75	76.9 ±0.75	33.94 ±1.78	5.25 ±0.35	28.7 ±1.56	5.0
MR12	11.41 ±2.2	7.46 ±0.51	10.2 ±0.59	78.23 ±3.31	107.3 ±4.00	27.08 ±1.87	72.92 ±1.87	27.24 ±0.65	3.85 ±0.4	23.39 ±0.76	5.0
MR13	3.52 ±0.39	11.43 ±0.52	16.65 ±1.65	83.14 ±1.45	114.74 ±2.1	27.53 ±1.00	72.47 ±1.00	28.99 ±1.23	5 ±0.63	23.99 ±0.87	5.6
MR14	9.74 ±0.67	9.06 ±0.54	12.87 ±0.28	84.39 ±2.43	116.06 ±2.62	27.29 ±0.55	72.71 ±0.55	33.36 ±1.38	4.88 ±0.46	28.48 ±0.92	5.6
MR15	0.89 ±0.45	8.72 ±0.26	12.76 ±1.37	79.65 ±7.62	102.02 ±8.11	21.99 ±1.54	78.01 ±1.54	30.13 ±1.63	4.57 ±0.2	25.55 ±1.6	5.6
MR16	14.39 ±1.01	7.27 ±1.01	12.72 ±0.45	86.66 ±0.95	121.03 ±1.88	28.4 ±0.35	71.6 ±0.35	57.24 ±2.38	5.25 ±0.64	51.99 ±2.84	5.0
MR17	12.02 ±1.45	8.59 ±0.83	10.59 ±0.69	82.48 ±3.94	113.67 ±4.78	27.45 ±1.16	72.55 ±1.16	36.24 ±2.89	5.19 ±0.29	31.05 ±2.76	5.0
MR18	12.07 ±4.15	11.69 ±0.75	10.26 ±0.51	77.38 ±5.31	111.39 ±3.45	30.55 ±3.97	69.45 ±3.97	39.29 ±1.93	4.56 ±0.51	34.74 ±1.43	3.8
MR19	0 ±0.00	7.36 ±0.43	7.42 ±0.49	73.7 ±8.04	88.49 ±7.93	16.81 ±1.67	83.19 ±1.67	40.53 ±1.81	5.15 ±0.87	35.39 ±0.98	5.6
MR20	17.2 ±1.72	10.12 ±0.33	12.13 ±1.6	76.8 ±6.56	116.25 ±6.8	34.01 ±1.89	65.99 ±1.89	36.51 ±1.62	5.79 ±0.19	30.72 ±1.59	5.6
MR21	18.81 ±0.69	5.52 ±0.51	8.58 ±0.88	72.13 ±5.66	105.03 ±7.62	31.35 ±0.41	68.65 ±0.41	33.18 ±2.1	5.55 ±0.32	27.62 ±1.82	6.3
MR22	10.42 ±1.2	8.48 ±0.9	10.12 ±1.02	87.18 ±8.33	116.21 ±8.19	25.06 ±2.16	74.94 ±2.16	34.04 ±1.57	4.04 ±0.12	30 ±1.48	4.4
MR23	14.88 ±2.18	4.41 ±0.63	7.78 ±0.17	81.15 ±2.47	108.21 ±1.26	25.01 ±2.29	74.99 ±2.29	37.76 ±1.96	4.96 ±0.68	32.8 ±1.72	5.0
MR24	13.54 ±2.11	5.99 ±0.88	9.04 ±1.61	82.44 ±5.72	111.01 ±6.71	25.76 ±1.02	74.24 ±1.02	30.83 ±1.77	4.34 ±0.17	26.49 ±1.9	5.6
MR25	4.23 ±0.35	6.83 ±0.57	11.58 ±1.9	79.76 ±4.33	102.4 ±4.19	22.12 ±2.05	77.88 ±2.05	32.3 ±1.32	4.51 ±0.12	27.79 ±1.21	5.0
MR26	5.53 ±0.73	5.32 ±0.65	10.52 ±1.22	86.63 ±3.57	108 ±3.37	19.8 ±1.43	80.2 ±1.43	28.71 ±2.04	3.93 ±0.45	24.78 ±1.72	5.6
MR27	10.02 ±1.51	3.66 ±0.18	7.01 ±0.12	73.15 ±2.62	93.83 ±1.68	22.06 ±1.63	77.94 ±1.63	29.32 ±1.77	3.52 ±0.1	25.79 ±1.88	6.3
MR28	9.48 ±0.73	3.93 ±0.49	5.8 ±0.93	83.86 ±4.89	103.07 ±6.52	18.61 ±1.08	81.39 ±1.08	41.9 ±3.44	5.25 ±0.14	36.66 ±3.35	5.0
MR29	11.23 ±1.09	3.5 ±0.2	5.74 ±1.05	77.23 ±3.12	97.69 ±4.01	20.95 ±0.8	79.05 ±0.8	32.13 ±1.69	4.6 ±0.57	27.53 ±1.57	5.0
MR30	8.99 ±1.42	2.83 ±0.47	3.87 ±0.58	75.22 ±3.59	90.92 ±5.62	17.21 ±1.13	82.79 ±1.13	23.36 ±1.79	3.7 ±0.2	19.67 ±1.64	6.3
MR31	20.34 ±2.01	4.8 ±0.2	7.62 ±0.23	71.3 ±8.76	104.06 ±6.68	31.66 ±4.1	68.34 ±4.1	29.94 ±0.75	4.59 ±0.36	25.35 ±0.4	5.0
MR32	7.93 ±0.38	5.66 ±0.69	8.02 ±0.79	73.58 ±9.63	95.19 ±10.04	22.82 ±2.24	77.18 ±2.24	39.32 ±2.77	4.5 ±0.46	34.83 ±2.36	5.6
MR33	15.01 ±1.9	8.19 ±0.77	11.34 ±1.22	72.57 ±6.94	107.11 ±8.28	32.31 ±1.31	67.69 ±1.31	24.87 ±1.68	3.81 ±0.61	21.05 ±1.96	5.0
MR34	11.68 ±0.76	6.48 ±0.28	11.12 ±0.68	76.67 ±5.49	105.95 ±6.96	27.65 ±0.81	72.35 ±0.81	20.75 ±1.12	3.6 ±0.36	17.15 ±0.95	6.9
MR35	10.25 ±0.81	8.86 ±0.94	12.69 ±0.98	76.19 ±4.41	107.99 ±6.6	29.44 ±0.34	70.56 ±0.34	31.47 ±1.24	4.2 ±0.26	27.26 ±1.26	5.0
MR36	12.95 ±1.54	6.85 ±0.4	9.92 ±0.34	72.38 ±0.85	102.1 ±2.37	29.09 ±1.25	70.91 ±1.25	30.85 ±1.51	3.94 ±0.12	26.9 ±1.59	5.6
MR37	9.07 ±1.38	12.13 ±1.35	14.13 ±1.17	79.7 ±3.27	115.03 ±3.01	30.73 ±1.03	69.27 ±1.03	33.39 ±2.18	4.25 ±0.27	29.14 ±2.09	4.4
MR38	15.82 ±0.91	10.94 ±0.79	13.33 ±0.15	79.81 ±3.11	119.89 ±2.48	33.45 ±1.25	66.55 ±1.25	33.45 ±1.00	4.54 ±0.15	28.92 ±0.88	4.4
MR39	22.58 ±0.99	6.53 ±0.58	9.25 ±0.26	82.17 ±0.83	120.53 ±2.3	31.82 ±0.64	68.18 ±0.64	24.22 ±1.72	3.43 ±0.17	20.8 ±1.56	5.0
MR40	10.48 ±0.86	16.04 ±1.18	16.73 ±0.96	81.65 ±3.31	124.9 ±2.66	34.64 ±1.58	65.36 ±1.58	29.15 ±2.4	4.6 ±0.31	24.55 ±2.13	4.4
MR41	7.38 ±0.85	7.74 ±0.3	11.4 ±0.21	82.77 ±3.56	109.28 ±4.25	24.77 ±0.79	75.73 ±0.79	31.66 ±2.23	4.82 ±0.19	26.84 ±2.28	4.4
MR42	16.54 ±2.53	15.84 ±1.06	23.71 ±0.35	85.72 ±10.2	141.81 ±10.61	39.68 ±2.89	60.32 ±2.89	28.02 ±1.05	4.79 ±0.39	23.24 ±0.67	6.3

ID\_Am – identificação da amostra composta; A Totais – Açúcares totais; A Sol – Açúcares solúveis; AInsol; Açúcares insolúveis; CFT – Conteúdo fenólico total; CFNT – Conteúdo fenólico não tatino; CT – Conteúdo Tanino.

**Tabela A 4** Valores médios das respostas isotópicas e elementares da espécie *Quercus roundifolia*.

ID_Am	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	N (%)	C (%)	C/N
MR01	-0.6	-25.8	1.0	44.6	44.6
MR02	2.6	-24.9	0.8	45.1	56.38
MR03	4.1	-24.6	1.0	44.2	44.2
MR04	1.9	-25.5	0.9	45.3	50.33
MR05	3.6	-25.1	1.0	43.8	43.8
MR06	0.6	-25.7	0.9	44.7	49.67
MR07	1.0	-23.4	0.7	44.1	63.0
MR08	0.4	-26.4	0.8	44.1	55.13
MR09	2.0	-24.3	0.9	44.2	49.11
MR10	1.7	-24.9	0.9	44.4	49.33
MR11	4.6	-24.4	0.8	43.5	54.38
MR12	2.8	-26.5	0.8	44.9	56.13
MR13	0.8	-26.4	0.9	44.2	49.11
MR14	0.5	-24.7	0.9	44.1	49.0
MR15	3.2	-26.9	0.9	43.5	48.33
MR16	2.0	-25.0	0.8	44.2	55.25
MR17	0.4	-25.0	0.8	44.5	55.63
MR18	2.9	-24.0	0.6	41.2	68.67
MR19	-0.3	-25.3	0.9	45.3	50.33
MR20	-1.5	-24.6	0.9	42.9	47.67
MR21	1.2	-24.2	1.0	44.3	44.3
MR22	0.1	-24.0	0.7	41.1	58.71
MR23	-1.3	-25.6	0.8	44.6	55.75
MR24	3.7	-26.1	0.9	44.9	49.89
MR25	0.9	-26.3	0.8	44.4	55.5
MR26	3.5	-26.7	0.9	44.4	49.33
MR27	3.6	-24.7	1.0	44.6	44.6
MR28	2.3	-25.7	0.8	44.8	56.0
MR29	1.3	-26.3	0.8	45.0	56.25
MR30	-0.7	-26.3	1.0	44.6	44.6
MR31	2.4	-25.8	0.8	44.3	55.38
MR32	0.1	-25.9	0.9	43.9	48.78
MR33	1.1	-25.6	0.8	43.5	54.38
MR34	1.8	-25.8	1.1	44.0	40.0
MR35	2.1	-27.1	0.8	43.6	54.5
MR36	2.4	-26.1	0.9	43.9	48.78
MR37	-0.5	-25.9	0.7	43.0	61.43
MR38	-1.9	-26.2	0.7	44.2	63.14
MR39	-0.8	-26.0	0.8	43.2	54.0
MR40	0.6	-27.2	0.7	41.7	59.57
MR41	-0.6	-25.8	0.7	38.7	55.29
MR42	1.2	-25.0	1.0	44.0	44.0

ID\_Am – identificação da amostra composta.

**Tabela A 5** Valores médios e respetivo desvio padrão das respostas morfológicas da espécie *Quercus suber*.

<b>ID_Am</b>	<b>Comprimento (mm)</b>	<b>Diâmetro (mm)</b>	<b>Volume (cm<sup>3</sup>)</b>	<b>Peso (g)</b>
MS01	32.45 ±2.75	16.05 ±1.6	4.46 ±1.22	5.71 ±0.35
MS02	35.08 ±3.41	18.53 ±2.69	6.5 ±2.13	9.81 ±3.15
MS03	-	-	-	13.15 ±1.33
MS04	35.87 ±3.62	17.02 ±0.86	5.47 ±0.88	7.9 ±1.05
MS05	33.74 ±5.07	17.71 ±1.65	5.7 ±1.74	8.16 ±2.7
MS06	32.09 ±3.92	18.49 ±2.47	5.96 ±2.09	9.13 ±2.53
MS07	31.48 ±5.14	15.11 ±2.63	4.03 ±1.96	6.33 ±3.01
MS08	31.82 ±3.12	15.84 ±1.88	4.26 ±1.14	6.82 ±1.34
MS09	36.11 ±5.63	17.15 ±2.18	5.8 ±2.21	8.23 ±3.28
MS10	31.6 ±3.34	16.97 ±0.56	4.79 ±0.75	6.87 ±0.00
MS11	31.81 ±3.96	15.73 ±2.21	4.31 ±1.59	6.4 ±2.32
MS12	36.13 ±2.7	16.66 ±1.22	5.32 ±1.02	7.94 ±0.2
MS13	32.7 ±3.47	16.85 ±1.43	4.96 ±1.3	7.55 ±1.77
MS14	30.23 ±4.86	16.53 ±2.04	4.49 ±1.68	7.13 ±2.37
MS15	28.11 ±3.56	16.61 ±1.98	4.18 ±1.38	6.29 ±1.89
MS16	31.41 ±4.49	15.53 ±2.17	4.17 ±1.75	5.8 ±2.03
MS17	33.07 ±3.43	18.69 ±2.08	6.17 ±1.74	9.4 ±2.45
MS18	31.4 ±5.06	15.21 ±1.47	3.93 ±1.37	5.61 ±2.17
MS19	34.96 ±4.00	15.63 ±1.63	4.56 ±1.27	6.49 ±1.63
MS20	35.69 ±2.09	17.64 ±0.88	5.84 ±0.83	7.41 ±1.25
MS21	30.42 ±3.89	15.22 ±1.95	3.84 ±1.25	5.3 ±1.13
MS22	-	-	-	10.49 ±1.72
MS23	-	-	-	5.89 ±1.5
MS24	-	-	-	7.8 ±1.19
MS25	-	-	-	5.43 ±2.3

ID\_Am – identificação da amostra composta.

**Tabela A 6** Valores médios e respetivo desvio padrão das respostas químicas da espécie *Quercus suber*.

ID_Am	Sacarose (mg/g)	Glucose (mg/g)	Frutose (mg/g)	Amido (mg EG/g)	A Totais (mg/g)	A Sol (%)	A Insol (%)	CFT (mg EAG/g)	CFNT (mg EAG/g)	CT (mg EAG/g)	Proteína (%)
MS01	0 ±0.00	11.73 ±0.08	15.31 ±1.17	56.6 ±5.13	83.64 ±4.54	32.41 ±2.76	67.59 ±2.76	29.11 ±2.26	3.1 ±0.44	26.01 ±1.87	8.1
MS02	0 ±0.00	11.25 ±0.46	15.59 ±0.98	58.98 ±3.81	85.82 ±2.67	31.32 ±2.34	68.68 ±2.34	32.26 ±1.19	3.97 ±0.39	28.28 ±1.5	8.1
MS03	2.92 ±0.29	10.84 ±0.38	14.22 ±2.22	59.48 ±7.48	87.47 ±9.44	32.09 ±1.76	67.91 ±1.76	79.23 ±6.15	6.62 ±0.77	72.61 ±5.74	4.4
MS04	3.97 ±0.93	9.02 ±0.72	14.78 ±0.22	52.77 ±7.9	80.54 ±8.48	34.69 ±3.05	65.31 ±3.05	29.26 ±3.85	4.71 ±0.46	24.54 ±3.41	6.3
MS05	0 ±0.00	9.02 ±0.41	13.81 ±1.48	53.06 ±5.5	75.89 ±6.03	30.17 ±2.00	69.83 ±2.00	37.57 ±4.24	4.27 ±0.34	33.31 ±4.08	5.6
MS06	0 ±0.00	7.02 ±1.1	11.47 ±1.99	50.86 ±7.05	69.34 ±8.09	26.77 ±1.63	73.23 ±1.63	29.42 ±1.48	4.19 ±0.37	25.23 ±1.45	7.5
MS07	0.8 ±0.15	7.48 ±0.34	12.8 ±1.54	50.96 ±4.14	72.03 ±4.93	29.28 ±1.93	70.72 ±1.93	33.53 ±1.9	5.13 ±0.5	28.41 ±1.89	6.3
MS08	0 ±0.00	14.28 ±0.74	19.08 ±0.63	49.2 ±5.62	82.57 ±6.03	40.53 ±2.49	59.47 ±2.49	35.74 ±1.9	4.81 ±0.53	30.93 ±1.38	6.3
MS09	0 ±0.00	19.36 ±0.43	15.74 ±2.31	48.77 ±5.87	83.88 ±8.3	41.94 ±1.52	58.06 ±1.52	22.56 ±2.1	4.7 ±0.08	17.86 ±2.18	7.5
MS10	1.66 ±0.28	6.54 ±0.06	8.06 ±1.32	42.58 ±1.12	58.85 ±1.84	27.64 ±1.23	72.36 ±1.23	36.3 ±1.83	4.79 ±0.37	31.51 ±1.56	7.5
MS11	10.2 ±0.85	3.55 ±0.41	5.09 ±0.47	44.47 ±0.46	63.32 ±0.67	29.76 ±0.28	70.24 ±0.28	27.98 ±0.52	4.35 ±0.35	23.64 ±0.41	6.3
MS12	3.12 ±0.3	6.86 ±0.72	6.91 ±0.47	47.16 ±0.82	64.06 ±1.83	26.35 ±1.1	73.65 ±1.1	31.97 ±1.04	4.9 ±0.09	27.06 ±0.96	7.5
MS13	0 ±0.00	9.84 ±0.3	10.27 ±0.14	44.1 ±6.00	64.22 ±6.17	31.49 ±2.63	68.51 ±2.63	31.52 ±1.27	4.26 ±0.52	27.26 ±1.41	6.3
MS14	2.91 ±0.38	8 ±0.56	8.59 ±0.69	48.9 ±5.39	68.4 ±6.49	28.58 ±1.08	71.42 ±1.08	27.37 ±1.57	3.93 ±0.24	23.44 ±1.6	5.6
MS15	3.79 ±0.58	8.62 ±1.28	8.7 ±0.28	48.03 ±5.87	69.14 ±6.05	30.67 ±2.48	69.33 ±2.48	36.96 ±1.23	4.37 ±0.7	32.59 ±0.94	7.5
MS16	0 ±0.00	9.23 ±0.4	5.91 ±0.78	51.9 ±2.54	67.04 ±3.14	22.59 ±0.3	77.41 ±0.3	37.87 ±1.32	4.29 ±0.43	33.59 ±1.59	5.6
MS17	0 ±0.00	8.81 ±1.02	9.05 ±0.46	52.53 ±4.06	70.39 ±3.36	25.44 ±2.19	74.56 ±2.19	28.86 ±1.79	4.48 ±0.55	24.38 ±2.13	6.3
MS18	0 ±0.00	9.59 ±0.76	10.6 ±2.4	41.31 ±6.56	61.5 ±6.1	33.1 ±4.11	66.9 ±4.11	27.73 ±0.92	4.67 ±0.15	23.07 ±1.03	8.1
MS19	0 ±0.00	5.62 ±0.67	8.17 ±0.97	42.93 ±4.5	56.72 ±4.88	24.38 ±2.46	75.62 ±2.46	45.09 ±3.27	4.8 ±0.32	40.29 ±3.52	8.8
MS20	0 ±0.00	7.07 ±0.24	9.72 ±1.01	49.46 ±4.82	66.25 ±5.07	25.41 ±2.13	74.59 ±2.13	42.94 ±3.31	5.12 ±0.32	37.82 ±3.14	6.3
MS21	0 ±0.00	7.48 ±0.21	13.19 ±1.74	39.81 ±2.68	60.49 ±4.61	34.15 ±0.63	65.85 ±0.63	24.62 ±1.21	4.4 ±0.56	20.21 ±0.67	8.1
MS22	0 ±0.00	11.53 ±1.05	13.53 ±1.22	39.38 ±5.48	64.45 ±7.02	39.02 ±2.69	60.98 ±	29.63 ±2.28	3.37 ±0.53	26.26 ±2.77	6.3
MS23	0 ±0.00	9.41 ±0.61	11.8 ±1.28	29.19 ±3.36	50.41 ±3.69	42.17 ±3.56	57.83 ±3.56	19.78 ±1.33	3.24 ±0.22	16.54 ±1.22	5.6
MS24	7.44 ±1.09	8.98 ±0.66	13.42 ±0.54	49.72 ±4.54	79.55 ±4.13	37.59 ±2.54	62.41 ±2.54	19.63 ±0.82	4.12 ±0.43	15.5 ±0.59	6.9
MS25	7.4 ±0.26	12.48 ±0.36	21.6 ±0.75	61.67 ±1.18	103.16 ±1.76	40.22 ±0.13	59.78 ±0.13	18.72 ±0.92	3.83 ±0.4	14.89 ±1.1	8.8

ID\_Am – identificação da amostra composta; A Totais – Açúcares totais; A Sol – Açúcares solúveis; A Insol; Açúcares insolúveis; CFT – Conteúdo fenólico total; CFNT – Conteúdo fenólico não tanino; CT – Conteúdo Tanino.

**Tabela A 7** Valores médios das respostas isotópicas e elementares da espécie *Quercus suber*.

ID_Am	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	N (%)	C (%)	C/N
MS01	0.7	-25.6	1.3	42.8	32.92
MS02	2.7	-27.6	1.3	35.5	27.31
MS03	-0.8	-26.9	0.7	43.2	61.71
MS04	0.9	-23.4	1.0	43.0	43.0
MS05	-2.3	-25.6	0.9	42.2	46.89
MS06	-0.8	-24.4	1.2	43.2	36.0
MS07	-0.8	-24.6	1.0	43.2	43.2
MS08	0.8	-26.2	1.0	42.2	42.2
MS09	1.9	-26.0	1.2	42.9	35.75
MS10	0.2	-26.1	1.2	44.7	37.25
MS11	1.8	-24.6	1.0	46.1	46.1
MS12	0.9	-26.6	1.2	42.6	35.5
MS13	1.6	-25.5	1.0	44.4	44.4
MS14	-0.3	-26.9	0.9	44.2	49.11
MS15	0.8	-24.8	1.2	45.0	37.5
MS16	-1.0	-27.9	0.9	43.9	48.78
MS17	-0.6	-25.8	1.0	45.0	45.0
MS18	1.9	-25.2	1.3	44.1	33.92
MS19	2.6	-25.4	1.4	43.8	31.29
MS20	0.1	-26.0	1.0	42.5	42.5
MS21	3.0	-26.2	1.3	41.3	31.77
MS22	0.2	-25.6	1.0	43.9	43.9
MS23	0.2	-26.6	0.9	42.8	47.56
MS24	1.0	-25.3	1.1	44.4	40.36
MS25	2.0	-25.4	1.4	43.6	31.14

ID\_Am – identificação da amostra composta.

## Anexo 2

**Tabela A 8** Análise de variância Kruskal–Wallis (Kruskal–Wallis one-way analysis of variance) para a aferição do efeito espécie nas respostas de bolota.

Grupo "VD"/Respostas	Variável dependente	Significância do efeito	Chi-squared	Df	p-value
Morfológicas	Comprimento (mm)	***	938.05	1	< 2.2e-16
	Diâmetro (mm)	ns	0.126	1	0.7226
	Volume (cm <sup>3</sup> )	***	158.29	1	< 2.2e-16
	Peso (g)	**	10.609	1	0.001126
Químicas	Sacarose (mg/g)	***	96.953	1	< 2.2e-16
	Glucose (mg/g)	**	7.6619	1	0.00564
	Frutose (mg/g)	ns	0.27459	1	0.6003
	Amido (mg eq Glu/g)	***	139.34	1	< 2.2e-16
	Açúcares totais (mg/g)	***	131.29	1	< 2.2e-16
	Açúcares solúveis (% Total)	***	19.164	1	1.2e-05
	Açúcares insolúveis (% Total)	***	19.164	1	1.2e-05
	Sacarose (%)	***	86.545	1	< 2.2e-16
	Glucose (%)	***	81.879	1	< 2.2e-16
	Frutose (%)	***	60.256	1	8.329e-15
	Proteína (%)	***	26.923	1	2.118e-07
Compostos Fenólicos	CFT (mg EAG/g)	ns	1.9364	1	0.1641
	CFNT (mg EAG/g)	ns	1.5341	1	0.2155
	CT (mg EAG/g)	ns	1.3418	1	0.2467
Isotópicas & Elementar	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	ns	2.6496	1	0.1036
	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	ns	0.58605	1	0.444
	N (%)	***	26.923	1	2.118e-07
	C (%)	*	5.0416	1	0.02475
	C/N	***	29.234	1	6.415e-08

CFT – Conteúdo fenólico total; CFNT – Conteúdo fenólico não tanino; CT – Conteúdo Tanino.

**Tabela A 9** Matriz de correlações de Spearman entre as respostas morfológicas, químicas e isotópicas e elementares em bolotas de *Q. rotundifolia* (QR; amarelo) e de *Q. suber* (QS; verde).

	Sac	Glu	Fru	Amido	AT	AS	AI	Comp	Diâm	Vol	P	$\delta^{15}\text{N}$	$\delta^{13}\text{C}$	%N	%C	C/N	Prot	CFT	CFNT	CT	
Sac	1.00	-0.11	-0.14	-0.09	<b>0.46**</b>	<b>0.72***</b>	<b>-0.72***</b>	-0.15	-0.04	-0.01	-0.10	-0.17	0.17	-0.15	0.08	0.19	-0.15	-0.02	-0.03	-0.02	
Glu	-0.27	1.00	<b>0.79***</b>	0.14	<b>0.51***</b>	<b>0.54***</b>	<b>-0.54***</b>	0.21	0.23	0.28	0.12	-0.04	0.10	-0.15	<b>-0.50***</b>	0.05	-0.15	0.14	0.24	0.13	
Fru	-0.13	<b>0.78***</b>	1.00	<b>0.33*</b>	<b>0.55***</b>	<b>0.48**</b>	<b>-0.48**</b>	0.19	0.16	0.20	0.12	-0.01	0.05	-0.05	<b>-0.38*</b>	-0.04	-0.05	-0.03	0.13	-0.04	
Amido	0.18	0.30	<b>0.45*</b>	1.00	<b>0.63***</b>	-0.11	0.11	0.04	-0.17	-0.11	-0.01	-0.11	-0.01	<b>-0.33*</b>	-0.14	0.30	<b>-0.33*</b>	0.00	0.01	0.00	
AT	0.17	<b>0.61**</b>	<b>0.74***</b>	<b>0.86***</b>	1.00	<b>0.64***</b>	<b>-0.64***</b>	-0.09	0.01	0.04	0.01	-0.20	0.13	<b>-0.40**</b>	<b>-0.34*</b>	<b>0.34*</b>	<b>-0.40**</b>	0.04	0.02	0.03	
AS	0.05	<b>0.70***</b>	<b>0.74***</b>	-0.10	0.31	1.00	-1.00	0.00	0.16	0.20	0.00	-0.12	0.18	-0.12	-0.28	0.08	-0.12	0.01	0.09	0.00	
AI	-0.05	<b>-0.70***</b>	<b>-0.74***</b>	0.10	-0.31	-1.00	1.00	0.00	-0.16	-0.20	0.00	0.12	-0.18	0.12	0.28	-0.08	0.12	-0.01	-0.09	0.00	
Comp	-0.17	0.13	0.28	0.34	0.33	0.01	-0.01	1.00	0.31	<b>0.57***</b>	<b>0.50**</b>	0.32	-0.01	0.07	0.04	-0.05	0.07	-0.34	-0.15	-0.31	
Diâm	-0.14	0.11	0.21	<b>0.47*</b>	0.43	-0.09	0.09	<b>0.59**</b>	1.00	<b>0.92***</b>	<b>0.80***</b>	0.25	-0.21	-0.16	0.04	0.17	-0.16	-0.10	-0.04	-0.07	
Vol	-0.18	0.04	0.18	<b>0.47*</b>	0.38	-0.19	0.19	<b>0.75***</b>	<b>0.94***</b>	1.00	<b>0.90***</b>	0.28	-0.17	-0.20	0.01	0.21	-0.20	-0.10	-0.07	-0.07	
P	-0.05	0.08	0.16	0.25	0.33	-0.09	0.09	<b>0.69***</b>	<b>0.89***</b>	<b>0.94***</b>	1.00	0.15	-0.25	-0.30	0.07	<b>0.33*</b>	-0.30	-0.06	-0.04	-0.07	
$\delta^{15}\text{N}$	0.10	0.12	0.19	-0.29	-0.09	0.38	-0.38	0.17	-0.20	-0.12	-0.27	1.00	0.10	0.21	0.14	-0.17	0.21	-0.10	-0.10	-0.09	
$\delta^{13}\text{C}$	0.30	-0.23	0.02	-0.01	0.00	0.06	-0.06	0.00	-0.05	-0.04	-0.12	0.13	1.00	0.07	-0.07	-0.08	0.07	<b>0.41**</b>	<b>0.31*</b>	<b>0.39**</b>	
%N	-0.03	-0.03	0.15	-0.09	-0.02	0.07	-0.07	0.08	-0.13	-0.06	-0.32	<b>0.72***</b>	0.27	1.00	<b>0.31*</b>	<b>-0.95***</b>	1.00	-0.28	0.01	-0.27	
%C	<b>0.41*</b>	-0.27	<b>-0.55**</b>	-0.22	-0.26	-0.24	0.24	-0.41	-0.13	-0.18	-0.06	-0.07	0.37	-0.08	1.00	-0.03	<b>0.31*</b>	-0.01	0.06	0.01	
C/N	0.09	-0.04	-0.27	0.02	-0.07	-0.12	0.12	-0.22	0.05	-0.02	0.25	<b>-0.71***</b>	-0.18	<b>-0.97***</b>	0.29	1.00	<b>-0.95***</b>	0.29	-0.01	0.30	
Prot	-0.03	-0.03	0.15	-0.09	-0.02	0.07	-0.07	0.08	-0.13	-0.06	-0.32	<b>0.72***</b>	0.27	1.00	-0.08	<b>-0.97***</b>	1.00	-0.28	0.01	-0.27	
CFT	-0.18	-0.23	-0.25	0.16	-0.04	<b>-0.56**</b>	<b>0.56**</b>	0.10	0.05	0.07	0.24	<b>-0.41*</b>	-0.18	-0.23	-0.11	0.18	-0.23	1.00	<b>0.65***</b>	<b>1.00***</b>	
CFNT	0.10	-0.32	-0.18	-0.01	-0.06	-0.32	0.32	0.25	-0.21	-0.11	0.13	-0.07	0.00	-0.07	-0.09	0.02	-0.07	<b>0.53**</b>	1.00	<b>0.60***</b>	
CT	-0.19	-0.20	-0.24	0.17	-0.02	<b>-0.56**</b>	<b>0.56**</b>	0.08	0.03	0.06	0.23	<b>-0.41*</b>	-0.20	-0.24	-0.11	0.19	-0.24	<b>1.00***</b>	<b>0.50*</b>	1.00	

Correlações significativas são destacadas a negrito. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ . Sac – Sacarose (mg/g); Glu – Glucose (mg/g); Fru – Frutose (mg/g); Amido – Amido (mg/g); AT – Açúcares totais (mg/g); AS – Açúcares solúveis (%); AI – Açúcares insolúveis (%); Comp – Comprimento (mm); Diâm – Diâmetro (mm); Vol – Volume ( $\text{cm}^3$ ); P – Peso (g);  $\delta^{15}\text{N}$  – conteúdo em isótopos estáveis de azoto (‰);  $\delta^{13}\text{C}$  – conteúdo em isótopos estáveis de carbono (‰); %N – conteúdo em azoto (%); %C – conteúdo em carbono (%); C/N – rácio entre carbono e azoto; Prot – Proteína (%); CFT – Conteúdo fenólico total (mg EAG/g); CFNT- Conteúdo fenólico não tanino (mg EAG/g); CT – Conteúdo em taninos (mg EAG/g).



## Anexo 3

**Tabela A 10** Análise de variância Kruskal–Wallis (Kruskal–Wallis one-way analysis of variance) para a aferição do efeito “espécie x classe de aridez” nas respostas de bolota.

Grupo "VD"/Respostas	Variável dependente	Significância do efeito	Chi-squared	Df	p-value
Morfológicas	Comprimento (mm)	***	892.55	3	< 2.2e-16
	Diâmetro (mm)	ns	2.2377	3	0.5246
	Volume (cm <sup>3</sup> )	***	144.8	3	< 2.2e-16
	Peso (g)	**	13.305	3	0.004022
Químicas	Sacarose (mg/g)	***	94.469	3	< 2.2e-16
	Glucose (mg/g)	***	19.668	3	0.0001989
	Frutose (mg/g)	ns	2.0513	3	0.5618
	Amido (mg eq Glu/g)	***	134.83	3	< 2.2e-16
	Açúcares totais (mg/g)	***	124.1	3	< 2.2e-16
	Açúcares solúveis (% Total)	***	36.281	3	6.531e-08
	Açúcares insolúveis (% Total)	***	36.281	3	6.531e-08
	Proteína (%)	***	26.447	3	7.689e-06
Compostos Fenólicos	CFT (mg EAG/g)	ns	1.8536	3	0.6033
	CT (mg EAG/g)	ns	1.375	3	0.7114
Isotópicas & Elementar	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	ns	4.4774	3	0.2143
	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	ns	1.1132	3	0.7739
	N (%)	***	26.447	3	7.689e-06
	C (%)	ns	5.8309	3	0.1201
	C/N	***	29.302	3	1.935e-06

CFT – Conteúdo fenólico total; CT – Conteúdo Tanino.

## Anexo 4

**Tabela A 11** Valores das variáveis bioclimáticas e ambientais e as coordenadas dos pontos amostrados da espécie *Quercus rotundifolia*.

ID_Am	Lat	Long	Bio01	Bio02	Bio03	Bio04	Bio05	Bio06	Bio07	Bio08	Bio09	Bio10	Bio11	Bio12	Bio13	Bio14	Bio15	Bio16	Bio17	Bio18	Bio19	PET	IA
MR01	38.664167	-8.094722	15.8917	10.4833	43.4993	511.2899	27.40	3.30	24.10	10.9000	22.2167	22.6000	10.0667	663.0	106.0	5.0	60.8288	288.0	31.0	38.0	275.0	1122	0.585
MR02	38.653611	-8.097778	15.9125	10.5083	43.4229	510.2946	27.50	3.30	24.20	10.9500	22.2333	22.6167	10.1000	661.0	106.0	4.0	61.1248	288.0	30.0	37.0	274.0	1123	0.579
MR03	38.590833	-7.894722	16.0500	12.0000	45.6274	524.6731	28.30	2.00	26.30	10.8333	22.6000	22.8333	10.0333	631.0	101.0	4.0	59.6057	271.0	31.0	38.0	259.0	1141	0.543
MR04	38.871111	-7.564167	15.6583	10.7833	42.1224	550.6890	27.80	2.20	25.60	10.2833	22.6167	22.8833	9.4500	649.0	97.0	5.0	56.8608	270.0	36.0	41.0	256.0	1153	0.590
MR05	39.098056	-7.436944	15.9417	10.9000	43.0830	534.1511	28.00	2.70	25.30	10.6500	22.6833	22.8167	9.8167	618.0	88.0	5.0	54.9627	251.0	35.0	43.0	237.0	1185	0.559
MR06	39.140833	-7.364722	15.8167	11.1167	42.1086	553.7161	28.30	1.90	26.40	10.3833	22.9000	22.9667	9.5500	630.0	89.0	5.0	54.5677	255.0	37.0	44.0	239.0	1179	0.581
MR07	38.841389	-7.191389	15.9708	11.6250	43.7030	552.3316	28.80	2.20	26.60	10.5000	22.9500	23.2167	9.7000	562.0	80.0	4.0	53.7145	224.0	33.0	40.0	210.0	1242	0.466
MR08	38.677778	-7.334722	15.8083	11.9000	45.9459	515.0853	28.00	2.10	25.90	10.6667	22.1833	22.5333	9.8667	570.0	85.0	4.0	56.3463	234.0	31.0	36.0	220.0	1224	0.471
MR09	38.674722	-7.484722	15.9000	12.2333	45.4771	530.4715	28.40	1.50	26.90	10.6333	22.5000	22.7667	9.8167	592.0	90.0	4.0	57.7579	247.0	30.0	36.0	233.0	1196	0.504
MR10	38.420556	-7.478056	16.4292	12.0250	45.5492	534.6599	28.90	2.50	26.40	11.1000	23.1333	23.3333	10.2833	553.0	88.0	4.0	58.4638	235.0	29.0	34.0	221.0	1226	0.445
MR11	38.392778	-7.331389	16.4000	10.9167	43.3201	525.9234	28.50	3.30	25.20	11.3667	23.0667	23.2833	10.4500	538.0	86.0	4.0	58.9776	231.0	28.0	33.0	216.0	1238	0.429
MR12	38.201667	-7.184722	16.6417	12.0500	43.5018	580.3871	30.00	2.30	27.70	10.9167	23.9833	24.1333	10.0500	546.0	89.0	4.0	60.2255	237.0	28.0	32.0	221.0	1228	0.438
MR13	38.154444	-7.105278	16.5667	11.9833	42.9510	591.6131	30.00	2.10	27.90	10.7333	24.0833	24.2000	9.8667	560.0	91.0	4.0	60.0703	243.0	29.0	33.0	225.0	1223	0.446
MR14	38.108611	-7.055556	16.3792	12.0917	43.1845	589.8053	29.90	1.90	28.00	10.6167	23.9000	24.0667	9.7500	568.0	92.0	4.0	60.2707	247.0	29.0	33.0	228.0	1217	0.452
MR15	38.080833	-7.150833	16.3250	12.0167	43.8564	567.1279	29.50	2.10	27.40	10.8167	23.5167	23.7667	9.9167	553.0	91.0	4.0	60.8559	242.0	28.0	32.0	224.0	1218	0.443
MR16	38.134167	-7.426944	16.5833	11.5667	44.3167	538.2773	29.00	2.90	26.10	11.2333	23.2667	23.5000	10.3500	538.0	90.0	3.0	61.0756	235.0	26.0	31.0	220.0	1228	0.429
MR17	38.700000	-7.929167	15.9833	11.4333	45.0131	523.8985	27.80	2.40	25.40	10.8333	22.5500	22.7833	10.0167	644.0	102.0	4.0	60.1985	278.0	31.0	37.0	266.0	1134	0.565
MR18	38.921667	-8.083889	16.3542	11.0250	45.0000	504.3513	27.80	3.30	24.50	11.3167	22.5667	22.8500	10.5000	657.0	102.0	5.0	59.6635	283.0	32.0	40.0	270.0	1131	0.580
MR19	38.883889	-8.173889	16.4625	10.9750	45.1646	496.3463	27.80	3.50	24.30	11.4833	22.5500	22.8333	10.6667	652.0	102.0	4.0	60.8160	283.0	30.0	37.0	269.0	1126	0.572
MR20	38.110833	-7.624444	16.7375	11.6083	45.5229	511.2735	28.70	3.20	25.50	11.6833	22.9833	23.3167	10.7667	534.0	91.0	3.0	62.0890	235.0	24.0	29.0	220.0	1238	0.423
MR21	37.840000	-7.513611	16.5708	11.5917	43.9078	545.6792	29.20	2.80	26.40	11.3000	23.3667	23.7000	10.3500	554.0	95.0	3.0	62.6842	246.0	25.0	30.0	229.0	1200	0.449
MR22	37.577222	-7.679722	17.1125	10.7583	42.5231	537.1648	29.40	4.10	25.30	11.8500	23.8333	24.0000	10.9333	542.0	99.0	3.0	66.7168	252.0	22.0	27.0	234.0	1171	0.451
MR23	37.685833	-7.727500	16.9583	11.0500	43.3333	533.2100	29.10	3.60	25.50	11.7000	23.5667	23.8167	10.8000	547.0	99.0	3.0	65.3080	250.0	23.0	28.0	234.0	1191	0.450
MR24	37.920000	-7.490556	16.4708	11.8917	44.8742	538.5100	29.10	2.60	26.50	11.2500	23.1167	23.5500	10.3333	544.0	93.0	3.0	62.2224	242.0	26.0	31.0	225.0	1213	0.444
MR25	37.912222	-7.744722	16.6250	11.7333	44.9553	526.2194	29.00	2.90	26.10	11.5167	23.0500	23.5167	10.5833	547.0	96.0	3.0	63.2948	244.0	24.0	29.0	230.0	1228	0.441
MR26	37.903333	-7.869444	16.6083	11.8667	45.4662	521.1082	28.80	2.70	26.10	11.6000	23.0500	23.4500	10.6500	550.0	97.0	3.0	63.4513	246.0	24.0	30.0	233.0	1229	0.443
MR27	37.691667	-8.301111	16.5958	11.2417	45.5128	493.1091	28.10	3.40	24.70	11.8833	22.7667	23.0167	10.9500	570.0	102.0	2.0	66.6989	264.0	22.0	27.0	248.0	1152	0.477
MR28	37.894444	-8.135000	16.6958	11.8083	46.3072	504.7162	28.50	3.00	25.50	11.8333	22.9833	23.2833	10.9167	563.0	100.0	3.0	64.6525	256.0	24.0	29.0	241.0	1195	0.458
MR29	38.184444	-8.108611	16.6750	11.3000	45.5645	496.7371	28.20	3.40	24.80	11.8500	22.8500	23.1167	10.9500	569.0	98.0	3.0	63.7845	256.0	24.0	30.0	242.0	1200	0.466
MR30	39.216667	-7.793056	16.3417	11.5333	44.5302	523.5102	28.50	2.60	25.90	11.1167	22.9667	23.0500	10.3167	666.0	98.0	5.0	57.2896	277.0	34.0	43.0	265.0	1153	0.602
MR31	39.048056	-7.446667	16.0083	11.2500	43.7743	538.4356	28.00	2.30	25.70	10.6333	22.7667	22.9500	9.8167	608.0	87.0	5.0	54.8639	247.0	35.0	42.0	233.0	1191	0.544
MR32	39.051111	-7.653611	16.1292	11.6417	44.0972	532.8801	28.50	2.10	26.40	10.8500	22.8667	23.0167	10.0500	642.0	94.0	5.0	56.7514	266.0	34.0	41.0	252.0	1160	0.578
MR33	38.958333	-8.198056	16.4500	10.8000	45.1883	490.3060	27.70	3.80	23.90	11.5500	22.4167	22.7500	10.7167	657.0	103.0	4.0	60.9152	286.0	30.0	38.0	272.0	1123	0.585
MR34	38.175572	-7.015571	16.3250	11.9833	43.5758	569.0842	29.70	2.20	27.50	10.7500	23.5500	23.7833	9.8833	546.0	89.0	4.0	60.6013	238.0	28.0	32.0	219.0	1232	0.431
MR35	38.213434	-7.364985	16.6167	11.4833	43.1704	560.8773	29.40	2.80	26.60	11.0833	23.6833	23.8500	10.2167	548.0	90.0	3.0	60.4321	238.0	27.0	32.0	222.0	1227	0.441
MR36	38.175220	-7.414210	16.6333	11.5667	44.1476	541.8291	29.20	3.00	26.20	11.2833	23.4000	23.6167	10.4000	536.0	89.0	3.0	61.0026	234.0	26.0	31.0	219.0	1235	0.427
MR37	38.318220	-7.830210	16.2333	11.8000	45.3846	524.6485	28.30	2.30	26.00	11.1000	22.8000	23.0667	10.2500	586.0	97.0	3.0	60.8228	254.0	27.0	33.0	241.0	1199	0.485
MR38	38.359296	-7.835749	15.9542	11.4750	44.3050	535.5815	28.00	2.10	25.90	10.7000	22.6833	22.9333	9.8667	614.0	101.0	4.0	59.9529	265.0	31.0	36.0	253.0	1178	0.517
MR39	38.422483	-7.834663	16.0500	12.0667	45.7071	527.5673	28.30	1.90	26.40	10.8333	22.6333	22.8833	10.0000	608.0	99.0	4.0	59.9991	262.0	30.0	36.0	250.0	1173	0.512
MR40	38.456099	-8.161383	16.2792	11.4250	45.5179	504.5676	28.00	2.90	25.10	11.3333	22.5500	22.8167	10.4667	629.0	104.0	4.0	62.0869	278.0	28.0	36.0	264.0	1153	0.528
MR41	38.517046	-8.079714	16.0583	10.7667	43.7669	513.1712	27.70	3.10	24.60	11.0500	22.4667	22.7500	10.2167	645.0	105.0	4.0	61.3098	282.0	30.0	36.0	268.0	1138	0.557
MR42	38.108181	-8.569174	16.2583	9.6333	43.1988	467.1764	27.00	4.70	22.30	11.7833	22.0667	22.3667	10.9167	632.0	108.0	4.0	65.2359	289.0	26.0	32.0	273.0	1119	0.547

ID\_Am – Identificação das amostras compostas; Lat – Latitude; Long – Longitude; Bio01 = temperatura média anual; Bio02 = amplitude da temperatura média diurna (média mensal (temperatura máxima – temperatura mínima)); Bio03 = isotermalidade (Bio02/Bio07) (\* 100); Bio04 = sazonalidade da temperatura (desvio padrão \*100); Bio05 = Temperatura Máxima do mês mais Quente; Bio06 = Temperatura mínima do mês mais frio; Bio07 = Amplitude da Temperatura Anual (Bio05-Bio06); Bio08 = Temperatura Média do Trimestre mais Húmido; Bio09 = Temperatura Média do Trimestre mais seco; Bio10 = Temperatura Média do Trimestre mais Quente; Bio11 = Temperatura Média do Trimestre mais Frio; Bio12 = Precipitação Anual; Bio13 = Precipitação no Mês mais Húmido; Bio14 = Precipitação no Mês mais seco; Bio15 = Sazonalidade da Precipitação (coeficiente de variação); Bio16 = Precipitação no Trimestre mais Húmido; Bio17 = Precipitação no Trimestre mais Seco; Bio18 = Precipitação no Trimestre mais quente; Bio19 = Precipitação no Trimestre mais frio; PET = Potencial de evapotranspiração; IA = índice de aridez.

**Tabela A 12** Valores das variáveis bioclimáticas e ambientais e as coordenadas dos pontos amostrados da espécie *Quercus suber*.

ID_Am	Lat	Long	Bio01	Bio02	Bio03	Bio04	Bio05	Bio06	Bio07	Bio08	Bio09	Bio10	Bio11	Bio12	Bio13	Bio14	Bio15	Bio16	Bio17	Bio18	Bio19	PET	IA
MS01	38.653611	-8.097778	15.9125	10.5083	43.4229	510.2946	27.50	3.30	24.20	10.9500	22.2333	22.6167	10.1000	661.0	106.0	4.0	61.1248	288.0	30.0	37.0	274.0	1123	0.579
MS02	38.767222	-7.710556	15.5708	10.6583	42.2950	542.2615	27.60	2.40	25.20	10.3000	22.3833	22.7000	9.4500	668.0	103.0	5.0	58.2296	282.0	35.0	41.0	269.0	1136	0.603
MS03	38.677778	-7.334722	15.8083	11.9000	45.9459	515.0853	28.00	2.10	25.90	10.6667	22.1833	22.5333	9.8667	570.0	85.0	4.0	56.3463	234.0	31.0	36.0	220.0	1224	0.471
MS04	38.701667	-7.914722	15.9500	11.3500	44.5098	528.4497	27.90	2.40	25.50	10.7500	22.5833	22.8167	9.9333	648.0	102.0	4.0	59.5096	278.0	32.0	38.0	265.0	1131	0.571
MS05	38.936111	-8.125000	16.3083	10.8333	44.9516	498.7249	27.60	3.50	24.10	11.3333	22.4167	22.7333	10.5167	663.0	103.0	5.0	60.0492	287.0	32.0	40.0	273.0	1129	0.578
MS06	38.956111	-8.106667	16.4750	10.9000	45.2282	493.0448	27.80	3.70	24.10	11.5000	22.4667	22.8000	10.7000	645.0	100.0	4.0	60.3023	279.0	30.0	38.0	265.0	1137	0.564
MS07	38.883889	-8.173889	16.4625	10.9750	45.1646	496.3463	27.80	3.50	24.30	11.4833	22.5500	22.8333	10.6667	652.0	102.0	4.0	60.8160	283.0	30.0	37.0	269.0	1126	0.572
MS08	38.295833	-7.723889	15.9417	11.5833	44.3806	540.3569	28.10	2.00	26.10	10.6500	22.7167	23.0000	9.8000	606.0	99.0	4.0	59.8859	260.0	30.0	35.0	247.0	1193	0.505
MS09	37.577222	-7.679722	17.1125	10.7583	42.5231	537.1648	29.40	4.10	25.30	11.8500	23.8333	24.0000	10.9333	542.0	99.0	3.0	66.7168	252.0	22.0	27.0	234.0	1171	0.451
MS10	37.912222	-7.744722	16.6250	11.7333	44.9553	526.2194	29.00	2.90	26.10	11.5167	23.0500	23.5167	10.5833	547.0	96.0	3.0	63.2948	244.0	24.0	29.0	230.0	1228	0.441
MS11	37.790000	-8.323611	16.6542	11.2417	45.8844	488.5808	28.00	3.50	24.50	11.9667	22.7333	23.0167	11.0500	574.0	101.0	3.0	65.5048	263.0	23.0	29.0	247.0	1162	0.472
MS12	39.397778	-7.931389	15.7333	10.0333	43.2471	494.7191	26.80	3.60	23.20	10.7000	21.7333	22.1333	9.9500	744.0	110.0	6.0	58.2308	312.0	38.0	46.0	302.0	1114	0.701
MS13	39.211667	-7.933889	16.2083	10.6500	43.6475	513.5121	27.70	3.30	24.40	11.0667	22.5667	22.8333	10.2667	690.0	103.0	5.0	58.1174	291.0	36.0	43.0	279.0	1129	0.634
MS14	39.322500	-7.426111	14.6167	9.1000	38.0753	550.7323	26.00	2.10	23.90	9.2000	21.5000	21.9333	8.4333	759.0	115.0	7.0	57.7808	324.0	45.0	50.0	306.0	1071	0.801
MS15	39.088611	-8.162222	16.5042	10.6417	44.9015	487.6635	27.60	3.90	23.70	11.6167	22.4500	22.7667	10.8000	671.0	102.0	5.0	59.5363	288.0	32.0	41.0	274.0	1122	0.599
MS16	39.193056	-7.994444	16.1458	10.4917	43.8982	505.3732	27.40	3.50	23.90	11.0667	22.3333	22.6667	10.2667	689.0	104.0	5.0	59.0994	293.0	34.0	41.0	281.0	1125	0.636
MS17	39.055000	-7.893611	16.3167	10.8500	44.2857	508.3500	27.90	3.40	24.50	11.2500	22.5833	22.8833	10.4500	650.0	98.0	4.0	58.7166	276.0	32.0	40.0	263.0	1147	0.583
MS18	38.987778	-8.026944	16.3458	10.8750	44.5697	503.4538	27.80	3.40	24.40	11.3000	22.5333	22.8333	10.5000	655.0	101.0	4.0	59.6717	281.0	31.0	39.0	268.0	1134	0.584
MS19	38.958333	-8.198056	16.4500	10.8000	45.1883	490.3060	27.70	3.80	23.90	11.5500	22.4167	22.7500	10.7167	657.0	103.0	4.0	60.9152	286.0	30.0	38.0	272.0	1123	0.585
MS20	38.735278	-8.618889	16.5208	9.4917	43.3409	457.8381	27.10	5.20	21.90	12.0000	22.0333	22.4667	11.1667	693.0	113.0	5.0	63.9442	313.0	29.0	38.0	293.0	1091	0.600
MS21	38.175572	-7.015571	16.3250	11.9833	43.5758	569.0842	29.70	2.20	27.50	10.7500	23.5500	23.7833	9.8833	546.0	89.0	4.0	60.6013	238.0	28.0	32.0	219.0	1232	0.431
MS22	38.318220	-7.830210	16.2333	11.8000	45.3846	524.6485	28.30	2.30	26.00	11.1000	22.8000	23.0667	10.2500	586.0	97.0	3.0	60.8228	254.0	27.0	33.0	241.0	1199	0.485
MS23	38.422483	-7.834663	16.0500	12.0667	45.7071	527.5673	28.30	1.90	26.40	10.8333	22.6333	22.8833	10.0000	608.0	99.0	4.0	59.9991	262.0	30.0	36.0	250.0	1173	0.512
MS24	38.456099	-8.161383	16.2792	11.4250	45.5179	504.5676	28.00	2.90	25.10	11.3333	22.5500	22.8167	10.4667	629.0	104.0	4.0	62.0869	278.0	28.0	36.0	264.0	1153	0.528
MS25	38.108181	-8.569174	16.2583	9.6333	43.1988	467.1764	27.00	4.70	22.30	11.7833	22.0667	22.3667	10.9167	632.0	108.0	4.0	65.2359	289.0	26.0	32.0	273.0	1119	0.547

ID\_Am – Identificação das amostras compostas; Lat – Latitude; Long – Longitude; Bio01 = temperatura média anual; Bio02 = amplitude da temperatura média diurna (média mensal (temperatura máxima – temperatura mínima)); Bio03 = isothermalidade (Bio02/Bio07) (\* 100); Bio04 = sazonalidade da temperatura (desvio padrão \* 100); Bio05 = Temperatura Máxima do mês mais Quente; Bio06 = Temperatura mínima do mês mais frio; Bio07 = Amplitude da Temperatura Anual (Bio05 - Bio06); Bio08 = Temperatura Média do Trimestre mais Húmido; Bio09 = Temperatura Média do Trimestre mais seco; Bio10 = Temperatura Média do Trimestre mais Quente; Bio11 = Temperatura Média do Trimestre mais Frio; Bio12 = Precipitação Anual; Bio13 = Precipitação no Mês mais Húmido; Bio14 = Precipitação no Mês mais seco; Bio15 = Sazonalidade da Precipitação (coeficiente de variação); Bio16 = Precipitação no Trimestre mais Húmido; Bio17 = Precipitação no Trimestre mais Seco; Bio18 = Precipitação no Trimestre mais quente; Bio19 = Precipitação no Trimestre mais frio; PET = Potencial de evapotranspiração; IA = índice de aridez.

**Tabela A 13** Matriz de correlações de Spearman entre as variáveis climáticas e ambientais explicativas em bolotas de *Q. rotundifolia* (QR; amarelo) e *Q. suber* (QS; verde).

	Bio01	Bio02	Bio03	Bio04	Bio05	Bio06	Bio07	Bio08	Bio09	Bio10	Bio11	Bio12	Bio13	Bio14	Bio15	Bio16	Bio17	Bio18	Bio19	PET	IA
Bio01	1.00	0.11	0.13	-0.01	<b>0.57***</b>	<b>0.51***</b>	0.05	<b>0.76***</b>	<b>0.65***</b>	<b>0.69***</b>	<b>0.74***</b>	-0.65***	0.00	-0.73***	<b>0.68***</b>	-0.32*	-0.83***	-0.80***	-0.33*	<b>0.38*</b>	-0.64***
Bio02	0.11	1.00	<b>0.40**</b>	<b>0.44**</b>	<b>0.63***</b>	-0.70***	<b>0.83***</b>	-0.29	<b>0.43**</b>	<b>0.45**</b>	-0.31*	-0.42**	-0.47**	-0.19	-0.19	-0.55***	-0.11	-0.20	-0.55***	<b>0.57***</b>	-0.49***
Bio03	0.27	<b>0.71***</b>	1.00	-0.55***	-0.18	-0.02	-0.11	<b>0.32*</b>	-0.31	-0.26	<b>0.35*</b>	0.03	0.17	-0.30	0.15	0.04	-0.19	-0.16	0.08	0.00	-0.05
Bio04	-0.45*	0.38	-0.23	1.00	<b>0.72***</b>	-0.60***	<b>0.83***</b>	-0.60***	<b>0.71***</b>	<b>0.67***</b>	-0.62***	-0.47**	-0.67***	0.07	-0.35*	-0.61***	0.12	-0.01	-0.64***	<b>0.55***</b>	-0.41***
Bio05	0.34	<b>0.88***</b>	<b>0.50*</b>	<b>0.46*</b>	1.00	-0.28	<b>0.79***</b>	-0.01	<b>0.95***</b>	<b>0.95***</b>	-0.04	-0.80***	-0.57***	-0.42**	0.12	-0.75***	-0.45**	-0.53**	-0.77***	<b>0.75***</b>	-0.78***
Bio06	<b>0.60**</b>	-0.60**	-0.20	-0.79***	-0.43*	1.00	-0.77***	<b>0.83***</b>	-0.13	-0.10	<b>0.84***</b>	-0.01	<b>0.48**</b>	-0.36*	<b>0.67***</b>	0.29	-0.50***	-0.38*	0.29	-0.27	0.00
Bio07	-0.07	<b>0.87***</b>	0.35	<b>0.73***</b>	<b>0.89***</b>	-0.75***	1.00	-0.51***	<b>0.65***</b>	<b>0.64***</b>	-0.54***	-0.48**	-0.65***	-0.07	-0.32*	-0.65***	0.01	-0.10	-0.67***	<b>0.64***</b>	-0.50***
Bio08	<b>0.89***</b>	-0.15	0.20	-0.70***	0.04	<b>0.78***</b>	-0.35	1.00	0.08	0.13	<b>1.00***</b>	-0.24	<b>0.44**</b>	-0.65***	<b>0.81***</b>	0.14	-0.77***	-0.65***	0.15	-0.07	-0.25
Bio09	<b>0.45*</b>	<b>0.71***</b>	0.34	<b>0.40*</b>	<b>0.90***</b>	-0.28	<b>0.77***</b>	0.16	1.00	<b>0.99***</b>	0.04	-0.78***	-0.52***	-0.41**	0.16	-0.68***	-0.47**	-0.53***	-0.71***	<b>0.70***</b>	-0.74***
Bio10	<b>0.49*</b>	<b>0.69***</b>	0.33	0.37	<b>0.89***</b>	-0.25	<b>0.75***</b>	0.19	<b>0.99***</b>	1.00	0.09	-0.79***	-0.46**	-0.48**	0.23	-0.66***	-0.53***	-0.60***	-0.69***	<b>0.70***</b>	-0.76***
Bio11	<b>0.87***</b>	-0.22	0.18	-0.75***	-0.04	<b>0.83***</b>	-0.42*	<b>0.99***</b>	0.09	0.13	1.00	-0.21	<b>0.45**</b>	-0.62***	<b>0.80***</b>	0.16	-0.74***	-0.63***	0.17	-0.10	-0.22
Bio12	-0.34	-0.78***	-0.45*	-0.31	-0.89***	0.28	-0.75***	-0.16	-0.74***	-0.71***	-0.08	1.00	<b>0.58***</b>	<b>0.67***</b>	-0.32*	<b>0.86***</b>	<b>0.68***</b>	<b>0.75***</b>	<b>0.87***</b>	-0.86***	<b>0.96***</b>
Bio13	-0.28	-0.83***	-0.50*	-0.39	-0.88***	<b>0.40*</b>	-0.79***	0.03	-0.74***	-0.76***	0.09	<b>0.79***</b>	1.00	-0.04	<b>0.51***</b>	<b>0.88***</b>	-0.11	-0.01	<b>0.87***</b>	-0.81***	<b>0.53***</b>
Bio14	-0.47*	-0.65***	-0.48*	-0.11	-0.78***	0.10	-0.59**	-0.36	-0.73***	-0.71***	-0.29	<b>0.88***</b>	<b>0.67***</b>	1.00	-0.76	<b>0.36*</b>	<b>0.91</b>	<b>0.90</b>	<b>0.36*</b>	-0.41**	<b>0.67</b>
Bio15	<b>0.68***</b>	0.09	0.14	-0.33	0.29	<b>0.43*</b>	0.01	<b>0.75***</b>	0.35	0.34	<b>0.70***</b>	-0.47*	-0.03	-0.62***	1.00	0.13	-0.88***	-0.81***	0.12	-0.06	-0.34
Bio16	-0.22	-0.89***	-0.50*	-0.46*	-0.95***	<b>0.47*</b>	-0.88***	0.05	-0.77***	-0.75***	0.13	<b>0.93***</b>	<b>0.92***</b>	<b>0.78***</b>	-0.20	1.00	0.29	<b>0.40**</b>	<b>0.99***</b>	-0.96***	<b>0.84***</b>
Bio17	-0.62***	-0.41*	-0.30	0.12	-0.59**	-0.16	-0.33	-0.60**	-0.54**	-0.53**	-0.53**	<b>0.77***</b>	0.38	<b>0.82***</b>	-0.90***	<b>0.55**</b>	1.00	<b>0.97***</b>	<b>0.31*</b>	-0.36*	<b>0.70***</b>
Bio18	-0.43*	-0.58**	-0.34	-0.12	-0.72***	0.09	-0.56**	-0.36	-0.62**	-0.59**	-0.28	<b>0.91***</b>	<b>0.55**</b>	<b>0.88***</b>	-0.74***	<b>0.73***</b>	<b>0.94***</b>	1.00	<b>0.41*</b>	-0.44**	<b>0.77***</b>
Bio19	-0.27	-0.87***	-0.49*	-0.42*	-0.94***	<b>0.42*</b>	-0.86***	-0.02	-0.77***	-0.76***	0.06	<b>0.95***</b>	<b>0.90***</b>	<b>0.81***</b>	-0.27	<b>0.99***</b>	<b>0.61**</b>	<b>0.78***</b>	1.00	-0.95***	<b>0.85***</b>
PET	0.15	<b>0.89***</b>	<b>0.48*</b>	<b>0.52**</b>	<b>0.93***</b>	-0.55**	<b>0.91***</b>	-0.13	<b>0.78***</b>	<b>0.78***</b>	-0.20	-0.86***	-0.89***	-0.69**	0.13	-0.96***	-0.47*	-0.65***	-0.95***	1.00	-0.86***
IA	-0.36	-0.78***	-0.47*	-0.26	-0.86***	0.27	-0.72***	-0.19	-0.70***	-0.67***	-0.11	<b>0.98***</b>	<b>0.75***</b>	<b>0.84***</b>	-0.52**	<b>0.89***</b>	<b>0.79***</b>	<b>0.93***</b>	<b>0.91***</b>	-0.83***	1.00

Correlações significativas são destacadas a negrito. \* p<0.05; \*\* p<0.01; \*\*\* p<0.001. Bio01 = temperatura média anual; Bio02 = amplitude da temperatura média diurna (média mensal (temperatura máxima – temperatura mínima)); Bio03 = isotermalidade (Bio02/Bio07) (\* 100); Bio04 = sazonalidade da temperatura (desvio padrão \*100); Bio05 = Temperatura Máxima do mês mais Quente; Bio06 = Temperatura mínima do mês mais frio; Bio07 = Amplitude da Temperatura Anual (Bio05-Bio06); Bio08 = Temperatura Média do Trimestre mais Húmido; Bio09 = Temperatura Média do Trimestre mais seco; Bio10 = Temperatura Média do Trimestre mais Quente; Bio11 = Temperatura Média do Trimestre mais Frio; Bio12 = Precipitação Anual; Bio13 = Precipitação no Mês mais Húmido; Bio14 = Precipitação no Mês mais seco; Bio15 = Sazonalidade da Precipitação (coeficiente de variação); Bio16 = Precipitação no Trimestre mais Húmido; Bio17 = Precipitação no Trimestre mais Seco; Bio18 = Precipitação no Trimestre mais quente; Bio19 = Precipitação no Trimestre mais frio; PET = Potencial de evapotranspiração; IA = índice de aridez.

**Tabela A 14** Análise de variância Kruskal–Wallis (Kruskal–Wallis one-way analysis of variance) para a aferição do efeito do índice de aridez (IA) nas respostas de bolota da espécie *Q. rotundifolia*.

Grupo "VD"/Respostas	Variável dependente	Significância do efeito	Chi-squared	Df	p-value
Morfológicas	Comprimento (mm)	***	564.62	32	< 2.2e-16
	Diâmetro (mm)	***	413.79	32	< 2.2e-16
	Volume (cm <sup>3</sup> )	***	423.35	32	< 2.2e-16
	Peso (g)	***	76.018	41	0.0007245
Químicas	Sacarose (mg/g)	***	118.04	41	2.182e-09
	Glucose (mg/g)	***	120.26	41	1.026e-09
	Frutose (mg/g)	***	114.15	41	8.06e-09
	Amido (mg eq Glu/g)	**	68.92	41	0.004093
	Açúcares totais (mg/g)	***	100.56	41	6.512e-07
	Açúcares solúveis (% Total)	***	114.1	41	8.193e-09
	Açúcares insolúveis (% Total)	***	114.1	41	8.193e-09
Compostos Fenólicos	CFT (mg EAG/g)	***	114.99	41	6.097e-09
	CT (mg EAG/g)	***	114.67	41	6.774e-09

CFT – Conteúdo fenólico total; CT – Conteúdo Tanino.

**Tabela A 15** Análise de variância Kruskal–Wallis (Kruskal–Wallis one-way analysis of variance) para a aferição do efeito da temperatura média anual (Bio01) nas respostas de bolota da espécie *Q. rotundifolia*.

Grupo "VD"/Respostas	Variável dependente	Significância do efeito	Chi-squared	Df	p-value
Morfológicas	Comprimento (mm)	***	564.62	32	< 2.2e-16
	Diâmetro (mm)	***	413.79	32	< 2.2e-16
	Volume (cm <sup>3</sup> )	***	423.35	32	< 2.2e-16
	Peso (g)	***	76.018	41	0.0007245
Químicas	Sacarose (mg/g)	***	118.04	41	2.182e-09
	Glucose (mg/g)	***	120.26	41	1.026e-09
	Frutose (mg/g)	***	114.15	41	8.06e-09
	Amido (mg eq Glu/g)	**	68.92	41	0.004093
	Açúcares totais (mg/g)	***	100.56	41	6.512e-07
	Açúcares solúveis (% Total)	***	114.1	41	8.193e-09
	Açúcares insolúveis (% Total)	***	114.1	41	8.193e-09
Compostos Fenólicos	CFT (mg EAG/g)	***	114.99	41	6.097e-09
	CT (mg EAG/g)	***	114.67	41	6.774e-09

CFT – Conteúdo fenólico total; CT – Conteúdo Tanino.

**Tabela A 16** Análise de variância Kruskal–Wallis (Kruskal–Wallis one-way analysis of variance) para a aferição do efeito da isothermalidade (Bio03) nas respostas de bolota da espécie *Q. rotundifolia*.

Grupo "VD"/Respostas	Variável dependente	Significância do efeito	Chi-squared	Df	p-value
Morfológicas	Comprimento (mm)	***	564.62	32	< 2.2e-16
	Diâmetro (mm)	***	413.79	32	< 2.2e-16
	Volume (cm <sup>3</sup> )	***	423.35	32	< 2.2e-16
	Peso (g)	***	76.018	41	0.0007245
Químicas	Sacarose (mg/g)	***	118.04	41	2.182e-09
	Glucose (mg/g)	***	120.26	41	1.026e-09
	Frutose (mg/g)	***	114.15	41	8.06e-09
	Amido (mg eq Glu/g)	**	68.92	41	0.004093
	Açúcares totais (mg/g)	***	100.56	41	6.512e-07
	Açúcares solúveis (% Total)	***	114.1	41	8.193e-09
	Açúcares insolúveis (% Total)	***	114.1	41	8.193e-09
Compostos Fenólicos	CFT (mg EAG/g)	***	114.99	41	6.097e-09
	CT (mg EAG/g)	***	114.67	41	6.774e-09

CFT – Conteúdo fenólico total; CT – Conteúdo Tanino.

**Tabela A 17** Análise de variância Kruskal–Wallis (Kruskal–Wallis one-way analysis of variance) para a aferição do efeito da amplitude da temperatura anual (Bio07) nas respostas de bolota da espécie *Q. rotundifolia*.

Grupo "VD"/Respostas	Variável dependente	Significância do efeito	Chi-squared	Df	p-value
Morfológicas	Comprimento (mm)	***	541.74	30	< 2.2e-16
	Diâmetro (mm)	***	371.03	30	< 2.2e-16
	Volume (cm <sup>3</sup> )	***	380.24	30	< 2.2e-16
	Peso (g)	**	65.183	37	0.002868
Químicas	Sacarose (mg/g)	***	103.17	37	3.67e-08
	Glucose (mg/g)	***	106.14	37	1.348e-08
	Frutose (mg/g)	***	97.963	37	2.053e-07
	Amido (mg eq Glu/g)	**	63.001	37	0.004862
	Açúcares totais (mg/g)	***	77.074	37	0.0001228
	Açúcares solúveis (% Total)	***	99.429	37	1.27e-07
	Açúcares insolúveis (% Total)	***	99.429	37	1.27e-07
Compostos Fenólicos	CFT (mg EAG/g)	***	102.93	37	3.969e-08
	CT (mg EAG/g)	***	102.32	37	4.87e-08

CFT – Conteúdo fenólico total; CT – Conteúdo Tanino.

**Tabela A 18** Análise de variância Kruskal–Wallis (Kruskal–Wallis one-way analysis of variance) para a aferição do efeito da precipitação no mês mais húmido (Bio13) nas respostas de bolota da espécie *Q. rotundifolia*.

Grupo "VD"/Respostas	Variável dependente	Significância do efeito	Chi-squared	Df	p-value
Morfológicas	Comprimento (mm)	***	345.47	20	< 2.2e-16
	Diâmetro (mm)	***	251.42	20	< 2.2e-16
	Volume (cm <sup>3</sup> )	***	274.73	20	< 2.2e-16
	Peso (g)	**	45.375	23	0.003574
Químicas	Sacarose (mg/g)	***	67.536	23	2.902e-06
	Glucose (mg/g)	***	81.75	23	1.649e-08
	Frutose (mg/g)	***	103.87	23	3.002e-12
	Amido (mg eq Glu/g)	***	50.673	23	0.0007513
	Açúcares totais (mg/g)	***	64.616	23	8.004e-06
	Açúcares solúveis (% Total)	***	75.733	23	1.536e-07
	Açúcares insolúveis (% Total)	***	75.733	23	1.536e-07
Compostos Fenólicos	CFT (mg EAG/g)	***	60.104	23	3.69e-05
	CT (mg EAG/g)	***	59.521	23	4.479e-05

CFT – Conteúdo fenólico total; CT – Conteúdo Tanino.

**Tabela A 19** Análise de variância Kruskal–Wallis (Kruskal–Wallis one-way analysis of variance) para a aferição do efeito da precipitação no mês mais seco (Bio14) nas respostas de bolota da espécie *Q. rotundifolia*.

Grupo "VD"/Respostas	Variável dependente	Significância do efeito	Chi-squared	Df	p-value
Morfológicas	Comprimento (mm)	***	30.269	3	1.211e-06
	Diâmetro (mm)	***	45.121	3	8.721e-10
	Volume (cm <sup>3</sup> )	***	29.346	3	1.894e-06
	Peso (g)	ns	2.3764	3	0.498
Químicas	Sacarose (mg/g)	ns	5.386	3	0.1456
	Glucose (mg/g)	***	23.672	3	2.924e-05
	Frutose (mg/g)	***	27.936	3	3.746e-06
	Amido (mg eq Glu/g)	**	12.076	3	0.007128
	Açúcares totais (mg/g)	**	13.55	3	0.003586
	Açúcares solúveis (% Total)	ns	7.5325	3	0.05673
	Açúcares insolúveis (% Total)	ns	7.5325	3	0.05673
Compostos Fenólicos	CFT (mg EAG/g)	*	9.7537	3	0.02078
	CT (mg EAG/g)	*	10.802	3	0.01284

CFT – Conteúdo fenólico total; CT – Conteúdo Tanino.

**Tabela A 20** Análise de variância Kruskal–Wallis (Kruskal–Wallis one-way analysis of variance) para a aferição do efeito da temperatura média anual (Bio01) nas respostas de bolota da espécie *Q. suber*.

Grupo "VD"/Respostas	Variável dependente	Significância do efeito	Chi-squared	Df	p-value
Morfológicas	Comprimento (mm)	***	209.61	19	< 2.2e-16
	Diâmetro (mm)	***	250.68	19	< 2.2e-16
	Volume (cm <sup>3</sup> )	***	210.42	19	< 2.2e-16
	Peso (g)	**	48.601	24	0.002125
Químicas	Sacarose (mg/g)	***	73.547	24	6.267e-07
	Glucose (mg/g)	***	69.169	24	2.919e-06
	Frutose (mg/g)	***	68.929	24	3.173e-06
	Amido (mg eq Glu/g)	***	53.048	24	0.00057
	Açúcares totais (mg/g)	***	62.745	24	2.591e-05
	Açúcares solúveis (% Total)	***	67.34	24	5.487e-06
	Açúcares insolúveis (% Total)	***	67.34	24	5.487e-06
Compostos Fenólicos	CFT (mg EAG/g)	***	69.715	24	2.415e-06
	CT (mg EAG/g)	***	69.658	24	2.464e-06

CFT – Conteúdo fenólico total; CT – Conteúdo Tanino.

**Tabela A 21** Análise de variância Kruskal–Wallis (Kruskal–Wallis one-way analysis of variance) para a aferição do efeito da isothermalidade (Bio03) nas respostas de bolota da espécie *Q. suber*.

Grupo "VD"/Respostas	Variável dependente	Significância do efeito	Chi-squared	Df	p-value
Morfológicas	Comprimento (mm)	***	209.61	19	< 2.2e-16
	Diâmetro (mm)	***	250.68	19	< 2.2e-16
	Volume (cm <sup>3</sup> )	***	210.42	19	< 2.2e-16
	Peso (g)	**	48.601	24	0.002125
Químicas	Sacarose (mg/g)	***	73.547	24	6.267e-07
	Glucose (mg/g)	***	69.169	24	2.919e-06
	Frutose (mg/g)	***	68.929	24	3.173e-06
	Amido (mg eq Glu/g)	***	53.048	24	0.00057
	Açúcares totais (mg/g)	***	62.745	24	2.591e-05
	Açúcares solúveis (% Total)	***	67.34	24	5.487e-06
	Açúcares insolúveis (% Total)	***	67.34	24	5.487e-06
Compostos Fenólicos	CFT (mg EAG/g)	***	69.715	24	2.415e-06
	CT (mg EAG/g)	***	69.658	24	2.464e-06

CFT – Conteúdo fenólico total; CT – Conteúdo Tanino.



**Tabela A 22** Análise de variância Kruskal–Wallis (Kruskal–Wallis one-way analysis of variance) para a aferição do efeito da temperatura mínima do mês mais frio (Bio06) nas respostas de bolota da espécie *Q. suber*.

Grupo "VD"/Respostas	Variável dependente	Significância do efeito	Chi-squared	Df	p-value
Morfológicas	Comprimento (mm)	***	192.38	13	< 2.2e-16
	Diâmetro (mm)	***	138.35	13	< 2.2e-16
	Volume (cm <sup>3</sup> )	***	130.65	13	< 2.2e-16
	Peso (g)	ns	28.81	16	0.02525
Químicas	Sacarose (mg/g)	***	51.598	16	1.272e-05
	Glucose (mg/g)	***	55.649	16	2.781e-06
	Frutose (mg/g)	***	44.817	16	0.000148
	Amido (mg eq Glu/g)	**	36.295	16	0.002633
	Açúcares totais (mg/g)	***	43.721	16	0.0002174
	Açúcares solúveis (% Total)	***	53.537	16	6.17e-06
	Açúcares insolúveis (% Total)	***	53.537	16	6.17e-06
Compostos Fenólicos	CFT (mg EAG/g)	***	46.962	16	6.903e-05
	CT (mg EAG/g)	***	46.158	16	9.202e-05

CFT – Conteúdo fenólico total; CT – Conteúdo Tanino.

**Tabela A 23** Análise de variância Kruskal–Wallis (Kruskal–Wallis one-way analysis of variance) para a aferição do efeito da precipitação anual (Bio12) nas respostas de bolota da espécie *Q. suber*.

Grupo "VD"/Respostas	Variável dependente	Significância do efeito	Chi-squared	Df	p-value
Morfológicas	Comprimento (mm)	***	209.61	19	< 2.2e-16
	Diâmetro (mm)	***	250.68	19	< 2.2e-16
	Volume (cm <sup>3</sup> )	***	210.42	19	< 2.2e-16
	Peso (g)	**	48.601	24	0.002125
Químicas	Sacarose (mg/g)	***	73.547	24	6.267e-07
	Glucose (mg/g)	***	69.169	24	2.919e-06
	Frutose (mg/g)	***	68.929	24	3.173e-06
	Amido (mg eq Glu/g)	***	53.048	24	0.00057
	Açúcares totais (mg/g)	***	62.745	24	2.591e-05
	Açúcares solúveis (% Total)	***	67.34	24	5.487e-06
	Açúcares insolúveis (% Total)	***	67.34	24	5.487e-06
Compostos Fenólicos	CFT (mg EAG/g)	***	69.715	24	2.415e-06
	CT (mg EAG/g)	***	69.658	24	2.464e-06

CFT – Conteúdo fenólico total; CT – Conteúdo Tanino.

**Tabela A 24** Análise de variância Kruskal–Wallis (Kruskal–Wallis one-way analysis of variance) para a aferição do efeito da sazonalidade da precipitação (Bio15) nas respostas de bolota da espécie *Q. suber*.

Grupo "VD"/Respostas	Variável dependente	Significância do efeito	Chi-squared	Df	p-value
Morfológicas	Comprimento (mm)	***	209.61	19	< 2.2e-16
	Diâmetro (mm)	***	250.68	19	< 2.2e-16
	Volume (cm <sup>3</sup> )	***	210.42	19	< 2.2e-16
	Peso (g)	**	48.601	24	0.002125
Químicas	Sacarose (mg/g)	***	73.547	24	6.267e-07
	Glucose (mg/g)	***	69.169	24	2.919e-06
	Frutose (mg/g)	***	68.929	24	3.173e-06
	Amido (mg eq Glu/g)	***	53.048	24	0.00057
	Açúcares totais (mg/g)	***	62.745	24	2.591e-05
	Açúcares solúveis (% Total)	***	67.34	24	5.487e-06
	Açúcares insolúveis (% Total)	***	67.34	24	5.487e-06
Compostos Fenólicos	CFT (mg EAG/g)	***	69.715	24	2.415e-06
	CT (mg EAG/g)	***	69.658	24	2.464e-06

CFT – Conteúdo fenólico total; CT – Conteúdo Tanino.

**Tabela A 25** Modelos de regressão múltipla sem significado estatístico em *Q. rotundifolia*.

		Comprimento (mm)			Diâmetro (mm)			Volume (cm³)			Peso (g)			Sacarose (mg/g)					
		β	βSE	R²	β	βSE	R²	β	βSE	R²	β	βSE	R²	β	βSE	R²			
Preditores	Bio01	sem resolução			-0.33	0.17	0.00	-0.30	0.17	0.00	0.26 0.15 0.00			-0.26	0.15	0.01			
	Bio03				sem resolução			sem resolução						-0.25	0.15	0.01			
	Bio07																		
	Bio13																		
	Bio14																		
	IA																		
Regressão	R múltiplo				0.33	0.30			0.26			0.34							
	R²				0.11	0.09			0.07			0.12							
	R²aj				0.08	0.06			0.04			0.07							
	F				3.72	3.07			2.89			2.57							
	p				0.063	0.090			0.097			0.089							
	SE da estimativa				1.02	0.84			1.44			5.83							
		Açúcares totais (mg/g)			CFT (mg/g)			CT (mg/g)			Proteína (%)			δ¹⁵N (‰)					
		β	βSE	R²	β	βSE	R²	β	βSE	R²	β	βSE	R²	β	βSE	R²			
Preditores	Bio01	-0.43	0.21	0.50	sem resolução			sem resolução			sem resolução			-0.26	0.15	###			
	Bio03	-0.30	0.16	0.15															
	Bio07																		
	Bio13																		
	Bio14																		
	IA																		
Regressão	R múltiplo	0.37												0.26					
	R²	0.14												0.07					
	R²aj	0.07												0.04					
	F	2.07												2.81					
	p	0.121												0.101					
	SE da estimativa	10.06												1.59					
		δ¹³C (‰)			N (%)			C (%)			C/N								
		β	βSE	R²	β	βSE	R²	β	βSE	R²	β	βSE	R²						
Preditores	Bio01	-0.42* 0.20 0.45			sem resolução			-0.19 0.16 #####			sem resolução								
	Bio03																		
	Bio07																		
	Bio13																		
	Bio14																		
	IA																		
Regressão	R múltiplo	0.31						0.19											
	R²	0.10						0.04											
	R²aj	0.05						0.01											
	F	2.13						1.53											
	p	0.132						0.223											
	SE da estimativa	0.88						1.24											

Bio01 = temperatura média anual; Bio03 = isothermalidade (Bio02/Bio07) (\* 100); Bio07 = amplitude da temperatura anual (Bio05-Bio06); Bio13 = precipitação no mês mais húmido; Bio14 = precipitação no mês mais seco; IA = índice de aridez.

**Tabela A 26** Modelos de regressão múltipla sem significado estatístico em *Q. suber*.

		Comprimento (mm)			Diâmetro (mm)			Volume (cm <sup>3</sup> )			Peso (g)			Glucose (mg/g)		
		$\beta$	$\beta$ SE	R <sup>2</sup>	$\beta$	$\beta$ SE	R <sup>2</sup>	$\beta$	$\beta$ SE	R <sup>2</sup>	$\beta$	$\beta$ SE	R <sup>2</sup>	$\beta$	$\beta$ SE	R <sup>2</sup>
Preditores	Bio01													-		
	Bio03													0.47*	0.22	0.25
	Bio06	0.28	0.23	0.00	sem resolução			sem resolução						-		
	Bio12										-0.37	0.21		0.47*	0.2152	0.25
	Bio15										-0.53*	0.21				
Regressão	R múltiplo	0.28									0.48					0.48
	R <sup>2</sup>	0.08									0.23					0.23
	R <sup>2</sup> aj	0.03									0.16					0.16
	F	1.50									3.37					3.34
	p	0.237									0.053					0.054
	SE da estimativa	2.20									1.68					2.85
		Frutose (mg/g)			Açúcares totais (mg/g)			Proteína (%)			$\delta^{15}\text{N}$ (‰)			N (%)		
		$\beta$	$\beta$ SE	R <sup>2</sup>	$\beta$	$\beta$ SE	R <sup>2</sup>	$\beta$	$\beta$ SE	R <sup>2</sup>	$\beta$	$\beta$ SE	R <sup>2</sup>	$\beta$	$\beta$ SE	R <sup>2</sup>
Preditores	Bio01	-0.79	0.42	0.79												
	Bio03															
	Bio06	0.49	0.36	0.71	sem resolução			0.24	0.23	0.29				0.36	0.19	0.00
	Bio12	-0.86*	0.36	0.72												
	Bio15							0.23	0.23	0.29	0.29	0.20	0.00			
Regressão	R múltiplo		0.47						0.42			0.29				0.36
	R <sup>2</sup>		0.22						0.18			0.08				0.13
	R <sup>2</sup> aj		0.11						0.10			0.04				0.09
	F		2.02						2.35			2.13				3.46
	p		0.141						0.119			0.158				0.076
	SE da estimativa		3.77						1.07			1.29				0.17
		C (%)			C/N											
		$\beta$	$\beta$ SE	R <sup>2</sup>	$\beta$	$\beta$ SE	R <sup>2</sup>									
Preditores	Bio01	0.29	0.20	0.00	-0.41	0.37	0.73									
	Bio03				0.42	0.28	0.52									
	Bio06															
	Bio12															
	Bio15				-0.11	0.30	0.57									
Regressão	R múltiplo		0.29				0.44									
	R <sup>2</sup>		0.08				0.19									
	R <sup>2</sup> aj		0.05				0.08									
	F		2.14				1.69									
	p		0.157				0.199									
	SE da estimativa		1.89				7.31									

Bio01 = temperatura média anual; Bio03 = isothermalidade (Bio02/Bio07) (\* 100); Bio06 = temperatura mínima do mês mais frio; Bio12 = precipitação anual; Bio15 = sazonalidade da precipitação (coeficiente de variação).

**Tabela A 27** Resumo das equações dos modelos de regressão linear múltipla não significativos ou não resolvidos para as respostas de bolota de *Q. rotundifolia* e de *Q. suber*.

Espécie	Parâmetro	Equação
QR	Comp	sem resolução
	Diâm	$32.25-0.96*\text{Bio01}$
	Vol	$17.51-0.72*\text{Bio01}$
	Peso	$4.97+6.33*\text{IA}$
	Sac	$106.84-1.40*\text{Bio03}-1.33*\text{Bio07}$
	AT	$471.69-13.21*\text{Bio01}-2.85*\text{Bio03}-5.45*\text{Bio14}$
	CFT	sem resolução
	CT	sem resolução
	Prot	sem resolução
	$\delta^{15}\text{N}$	$7.22-0.06*\text{Bio13}$
	$\delta^{13}\text{C}$	$-12.86-0.33*\text{Bio07}-0.04*\text{Bio13}$
	N	sem resolução
	C	$47.28-0.04*\text{Bio13}$
	C/N	sem resolução
QS	Comp	$30.19+0.80*\text{Bio06}$
	Diâm	sem variáveis explicativas
	Vol	sem variáveis explicativas
	Peso	$38.20-0.01*\text{Bio12}-0.38*\text{Bio15}$
	Glu	$65.85-0.88*\text{Bio03}-0.03*\text{Bio12}$
	Fru	$153.16-6.80*\text{Bio01}+2.29*\text{Bio06}-0.06*\text{Bio12}$
	AT	sem variáveis explicativas
	Glu/Fru	$1.75+0.39*\text{Bio01}-0.09*\text{Bio03}-0.05*\text{Bio15}$
	Prot	$-0.43+0.32*\text{Bio06}+0.10*\text{Bio15}$
	$\delta^{15}\text{N}$	$-8.45+0.15*\text{Bio15}$
	N	$0.85+0.08*\text{Bio06}$
	%C	$23.65+1.21*\text{Bio01}$
	C/N	$81.38-6.63*\text{Bio01}+1.94*\text{Bio03}-0.32*\text{Bio15}$

Comp – comprimento da bolota (mm); Diâm – Diâmetro da bolota (mm); Vol – volume da bolota (cm<sup>3</sup>); P – peso da bolota (g); Sac – sacarose (mg/g); Glu – Glucose (mg/g); Fru – frutose (mg/g); Amido – amido (mg/g); AT – açúcares totais (mg/g); AS – açúcares solúveis (%); AI – percentagem de açúcares insolúveis (%);  $\delta^{15}\text{N}$  – conteúdo em isótopos estáveis de azoto (%);  $\delta^{13}\text{C}$  – conteúdo em isótopos estáveis de carbono (%); N – conteúdo em azoto (%); C – conteúdo em carbono (%); C/N – rácio entre carbono e azoto; Prot – teor em proteína (%); CFT – conteúdo em fenólicos totais (mg EAG/g); CFNT – conteúdo fenólico não tanino (mg EAG/g); CT – conteúdo em taninos (mg EAG/g).